

Analyse des [NiFe]-Zentrums und der Kofaktoren im H₂-Sensor von *Ralstonia eutropha* H16

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl. Biol. Antje Gebler, geb. Porthun,
geboren am 14.03.1971 in Bergen auf Rügen

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin:

Prof. Dr. Dr. h.c. C. Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I:

Prof. Dr. C. Limberg

Gutachter/innen:

Prof. Dr. Bärbel Friedrich
Prof. Dr. Wolfgang Lockau
Prof. Dr. Holger Dau

Tag der mündlichen Prüfung:

09.05.2008

eingereicht am:

19.12.2007

Diese Arbeit wurde unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Bärbel Friedrich am Institut für Biologie der Humboldt-Universität zu Berlin angefertigt.

Die Untersuchungen wurden aus Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft gefördert.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Haumann, M., Porthun, A., Buhrke, T., Liebisch, P., Meyer-Klauke, W. and Friedrich, B. 2003. Hydrogen-induced structural changes at the nickel site of the regulatory [NiFe] hydrogenase from *Ralstonia eutropha* detected by X-ray absorption spectroscopy. *Biochemistry* **42(37)**: 11004-11015.

Buhrke, T., Lenz, O., Porthun, A., and Friedrich, B. 2004. The H₂-sensing complex of *Ralstonia eutropha*: interaction between a regulatory [NiFe] hydrogenase and a histidine protein kinase. *Mol Microbiol* **51(6)**: 1677-1689.

Gebler, A., Burgdorf, T., de Lacey, AL., Rudiger, O., Martinez-Arias, A., Lenz, O., and Friedrich, B. 2007. Impact of alterations near the [NiFe] active site on the function of the H₂ sensor from *Ralstonia eutropha*. *FEBS J* **274(1)**:74-85.

Zusammenfassung

Hydrogenasen spielen eine prominente Rolle im Energiestoffwechsel vieler Mikroorganismen. Sie katalysieren die reversible Spaltung von molekularem Wasserstoff in Protonen und Elektronen. Das β -Proteobakterium *Ralstonia eutropha* besitzt zwei [NiFe]-Hydrogenasen, die das Wachstum mit H_2 als alleiniger Energiequelle in Gegenwart von Sauerstoff ermöglichen. Unter aeroben Bedingungen ist molekularer Wasserstoff in geringen und schwankenden Konzentrationen vorhanden, so dass eine Steuerung der Hydrogenase-Genexpression in Abhängigkeit von Wasserstoff für den Organismus ökonomisch ist. Reguliert wird die Expression durch ein bakterielles Zweikomponentensystem. Die Signaltransduktionskette besteht aus einer H_2 -sensierenden, regulatorischen [NiFe]-Hydrogenase (RH), einer Histidin-Proteinkinase und einem Response-Regulator. Die RH liegt in der Zelle als Doppeldimer vor, bestehend aus je zwei großen und zwei kleinen Untereinheiten. Die große Untereinheit trägt das katalytische [NiFe]-Zentrum und die kleine Untereinheit enthält mehrere elektronenleitende FeS-Cluster. Zusammen mit der Histidin-Proteinkinase bildet die RH einen stabilen Komplex. Ziel der Dissertation war es, (i) Einblicke in die Struktur-Funktionsbeziehung der RH zu gewinnen, sowie (ii) den Mechanismus der Signalübertragung näher zu beleuchten. *R. eutropha* diente dabei als Modellorganismus.

Um die erstgenannte Fragestellung zu lösen, wurden Aminosäure-Austausche im konservierten L0-Motiv (RxEGD) nahe des [NiFe]-Zentrums der großen Untereinheit HoxC der RH durchgeführt. Der Austausch des strikt konservierten Glu13 (E13Q, E13L) resultierte im Verlust der regulatorischen, der H_2 -oxidierenden und der D_2/H^+ -Austauschaktivitäten. Spektroskopische Daten wiesen auf ein vollständig assembliertes [NiFe]-Zentrum hin. Mit Hilfe der *ortho-/para*-Konversionsaktivität wurde nachgewiesen, dass dieses Zentrum nach wie vor H_2 binden kann. Dies deutet darauf hin, dass allein die H_2 -Bindung am aktiven Zentrum nicht für die regulatorische Funktion des H_2 -Sensors ausreicht. Durch den Austausch des Asp15, einer Aminosäure, die eine Besonderheit der regulatorischen Hydrogenasen ist, durch His wurde der Konsensus eines konservierten Motivs der Standard-[NiFe]-Hydrogenasen hergestellt. Das entstandene RH-Mutantenprotein besaß nur noch eine sehr niedrige H_2 -oxidierende Aktivität, bei nahezu unveränderter D_2/H^+ -Austauschrate sowie intakter regulatorischer Aktivität. Verglichen mit dem Wildtyp war die H_2 -abhängige Signalübertragung in dieser Mutante jedoch weniger sensitiv gegenüber Sauerstoff. Dies deutet darauf hin, dass der H_2 -Umsatz nicht entscheidend für die H_2 -Sensierung ist. Er scheint sich eher nachteilig auf die Funktion des H_2 -Sensors unter hohen O_2 -Konzentrationen auszuwirken.

Eine wichtige Voraussetzung zur Lösung der zweiten Fragestellung bildet die Isolierung großer Mengen RH. Dafür wurde in der vorliegenden Arbeit die *Strep*-tag-Technologie etabliert. So war es möglich, das RH-Doppeldimer als natives und auch als *Strep*-tag-Fusionsprotein zu reinigen, um es dann der Röntgenabsorptionsspektroskopie (XAS) zu unterziehen. Diese in der Arbeitsgruppe von M. Haumann durchgeführten Experimente geben Aufschluss über die unmittelbare Ligandensphäre von Nickel. Erstmals wurden dabei der Oxidationsstatus und die atomare Struktur der Nickelumgebung im [NiFe]-Zentrum sowohl in Abwesenheit als auch in Gegenwart von H_2 untersucht. Die Daten aus der XAS-Analyse wiesen auf eine Ni-Koordination in der reduzierten und oxidierten RH hin, die sich von der in Standard-Hydrogenasen deutlich unterscheidet. Ferner konnte gezeigt werden, dass sich die Ni-Koordination der RH in Gegenwart von H_2 verändert, was eine Konformationsänderung anzeigt, die möglicherweise entscheidend ist für die Signalübertragung.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Biodiversität des Wasserstoffmetabolismus.....	1
1.2 Klassifizierung der Hydrogenasen.....	2
1.3 Struktur und Katalyse von [NiFe]-Hydrogenasen.....	7
1.4 Maturation der Hydrogenasen.....	9
1.5 Die Hydrogenasen von <i>Ralstonia eutropha</i> H16.....	12
1.6 Aufgabenstellung.....	17
2 Material und Methoden.....	19
2.1 Organismen und Plasmide.....	19
2.2 Nährmedien.....	22
2.2.1 Medien für die Anzucht von <i>Ralstonia eutropha</i>	22
2.2.2 Medien für die Anzucht von <i>Escherichia coli</i>	23
2.2.3 Antibiotika und andere Medienzusätze.....	23
2.3 Zellanzucht und Ernte.....	24
2.4 Bestimmung von Wachstumsparametern.....	25
2.5 Konservierung von Bakterienstämmen	25
2.6 Zellaufschluss und Herstellung von Extrakten.....	25
2.7 Reinigung der RH	26
2.8 Reinigung von HoxB ^{Strep-tag} -HoxC.....	27
2.9 Reinigung von 6xHis-HoxJ ^{Input} -RH.....	28
2.10 Enzymaktivitätsbestimmungen	29
2.10.1 H ₂ -Oxidierende Aktivität der RH.....	29
2.10.2 D ₂ -/H ⁺ -Austausch der RH.....	30
2.10.3 Para-H ₂ -/ortho-H ₂ -Konversion der RH.....	31
2.10.4 β-Galaktosidase.....	31
2.11 Proteinbezogene Techniken.....	32
2.11.1 Proteinbestimmung.....	32
2.11.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	32
2.11.2.1 Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen (SDS-PAGE).....	32
2.11.2.2 Gelelektrophorese unter nativen Bedingungen (native PAGE).....	33
2.11.2.3 Färbung der Proteine im Polyacrylamidgel mit Coomassie-Blau.....	33
2.11.2.4 Nachweis von RH-Aktivität nach nativer PAGE.....	33
2.11.3 Immunoblot-Analyse.....	33
2.11.3.1 Antikörper.....	33
2.11.3.2 Proteintransfer.....	34
2.11.3.3 Detektion markierter Proteine.....	34
2.12 Spektroskopie	35
2.12.1 Röntgenabsorptionsspektroskopie (XAS).....	35
2.12.2 Elektronenspinresonanzspektroskopie (EPR).....	35
2.12.3 Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (FTIR).....	35
2.13 DNA-Grundtechniken.....	35
2.13.1 Behandlung von Geräten und Lösungen.....	35
2.13.2 DNA-Konzentrationsbestimmung.....	35
2.13.3 Konzentrierung von DNA.....	36
2.13.4 Restriktion von DNA.....	36
2.13.5 Agarose-Gelelektrophorese.....	37
2.13.6 Behandlung von überhängenden 5'- und 3'-DNA-Enden.....	37

2.13.7 Dephosphorylierung von DNA.....	38
2.13.8 Phosphorylierung von DNA.....	38
2.13.9 Ligierung von DNA-Fragmenten.....	38
2.13.10 Plasmid-Transfer.....	39
2.13.10.1 Transformation.....	39
2.13.10.2 Elektrottransformation.....	39
2.13.10.3 Konjugation.....	40
2.13.11 DNA-Isolierung.....	41
2.13.11.1 Plasmid-Isolierung für analytische Zwecke.....	41
2.13.11.2 Plasmid-Isolierung für präparative Zwecke.....	41
2.13.12 Polymerase-Kettenreaktion.....	41
2.13.13 DNA-Sequenzierung.....	42
2.13.13.1 Sequenzreaktion.....	42
2.13.13.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	43
2.14 Genetische Konstruktionen.....	43
2.14.1 Nukleotidaustausche in <i>hoxC</i>	44
2.14.1.1 HoxC R411.....	44
2.14.1.2 HoxC V12.....	45
2.14.1.3 HoxC E13.....	45
2.14.1.4 HoxC D15.....	46
2.14.2 In-Frame-Deletionen innerhalb der RH-Strukturgene.....	46
2.14.2.1 HoxC[ΔQ244-A268].....	46
2.14.2.2 HoxB[ΔQ155-L162].....	47
2.14.2.3 HoxB[ΔQ155-S166].....	47
2.14.3 Konstruktion der RH- <i>Strep</i> -tag.....	48
2.15 Dokumentation und Datenverarbeitung.....	49
2.16 Chemikalien und Enzyme.....	49
3 Ergebnisse.....	50
3.1 Etablierung von Reinigungstechniken für die RH.....	50
3.1.1 Reinigung der RH durch hydrophobe Interaktion und Anionenaustausch-Chromatographie	50
3.1.2 Anreicherung der RH durch Komplexbildung mit dem HoxJ ^{Input} -His ₆ -Fusionsprotein.....	51
3.1.3 <i>Strep</i> -tag-II-Technik.....	52
3.2 Das Redox-Verhalten oligomerer Formen der RH.....	55
3.2.1 Versuche zur Isolierung und Identifizierung eines NAD ⁺ -ähnlichen Kofaktors aus der RH.....	56
3.3 Strukturelle Besonderheiten des H ₂ -Sensors.....	59
3.3.1 Modellierung der Tertiärstruktur und ihre funktionelle Bedeutung.....	59
3.3.2 Deletion der Schleifen in den Untereinheiten HoxC und HoxB.....	61
3.3.3 Identifizierung verschiedener RH-Konformationen.....	63
3.4 Das aktive Zentrum der RH.....	65
3.4.1 Röntgenabsorptionsspektroskopie am [NiFe]-Zentrum der RH.....	65
3.4.2 Spektroskopische Analysen am RH _{Stopp} -Protein.....	69
3.5 Aminosäure-Austausche am [NiFe]-Zentrum der RH.....	72
3.5.1 Die konservierten Motive in der katalytischen Untereinheit von [NiFe]-Hydrogenasen.....	72
3.5.1.1 Austausche im L4- und L0-Motiv von HoxC.....	74
3.5.1.2 Auswirkung von Aminosäure-Austauschen auf das lithoautotrophe Wachstum.....	76
3.5.1.3 Einfluss der Aminosäure-Austausche auf die H ₂ -sensierende Aktivität.....	79
3.5.1.4 Katalytische Eigenschaften der modifizierten RH-Proteine.....	80
3.5.1.5 <i>Para</i> -H ₂ -/ <i>ortho</i> -H ₂ -Konversion ausgewählter RH-Mutantenproteine.....	82
3.5.1.6 Stabilität der modifizierten RH-Proteine.....	83

3.5.1.7 Nickel-Inkorporation in HoxC.....	84
3.5.1.8 Komplexbildung der RH-Mutantenproteine mit der Histidin-Proteinkinase HoxJ.....	86
3.5.1.9 Spektroskopische Untersuchungen am [NiFe]-Zentrum der RH-Mutantenproteine.....	87
4 Diskussion.....	92
4.1 Der H ₂ -sensierende Komplex von <i>Ralstonia eutropha</i>	92
4.1.1 Ungewöhnliche Strukturen und Kofaktoren im H ₂ -Sensor von <i>R. eutropha</i>	94
4.2 Das katalytische Zentrum des H ₂ -Sensors.....	97
4.2.1 Ligandierung des Nickels in der RH.....	97
4.2.2 Die Funktion konservierter Aminosäuren in HoxC.....	100
4.2.2.1 Charakteristische Sequenzmotive bestimmen die besonderen katalytischen Eigenschaften der RH.....	100
4.2.2.2 H ₂ -Bindung ist nicht ausreichend für die H ₂ -Sensierung.....	103
4.2.2.3 Sauerstofftoleranz des H ₂ -sensierenden Komplexes.....	104
4.2.2.4 Die H ₂ -Sensierung erfolgt unabhängig vom H ₂ -Umsatz	106
4.2.3 Beteiligung der Aminosäure R411 in HoxC an der Bindung bzw. Stabilisierung eines Brückenliganden.....	107
 Anhang.....	 113
Literaturverzeichnis.....	121

Abkürzungen

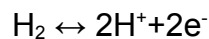
A	Ampere
Å	Angström
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATCC	American Type Culture Collection
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
CTAB	N-Cetyl-N,N,N-trimethylammoniumbromid
CV	Säulenvolumen
D ₂ /H ⁺	Deuterium-Protonen-Austausch
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DSM	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen
DTT	Dithiothreitol
ε	Extinktionskoeffizient
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPR	Elektronenspinresonanz
EXAFS	erweiterte Röntgenstrahlen-Absorptions-Feinstruktur
FGN	Fruktose-Glycerin-Mineralmedium
FN	Fruktose-Mineralmedium
FTIR	Fourier-Transformations-Infrarot
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
G	Gauss
h	Stunde(n)
HABA	2-[4'-Hydroxyphenylazo]benzoesäure
IPTG	Isopropyl-β-thiogalaktopyranosid
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
Kan	Kanamycin
LB	Luria Broth
LSLB	„low salt“-Luria Broth
MBH	Membrangebundene Hydrogenase
min	Minute(n)
MOPS	Morpholinhydroxypropansulfonsäure
NAD(H)	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid (reduziert)
Na-DOC	Natrium-Desoxycholat

NBT	p-Nitroblautetrazoliumchlorid
NTA	Nitlotriacetat
NTP	Nukleinsäuretriphosphat
ODxx	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von xx nm
o-NPG	2-Nitrophenol-b-D-Galaktopyranosid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PMS	Phenazinmethosulfat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RH	Regulatorische Hydrogenase
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
s	Sekunde(n)
SH	Lösliche Hydrogenase
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tet	Tetracyclin
TEMED	N,N,N',N'-Tetraethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit, Einheit der Enzymaktivität
U/min	Umdrehungen pro Minute
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
XAS	Röntgenstrahlen-Absorptionsspektroskopie

1 Einleitung

1.1 Biodiversität des Wasserstoffmetabolismus

Wasserstoff stellt das am weitesten verbreitete Element in unserem Universum dar und ist mit einem Massenanteil von 0.81 % am Aufbau der Erdkruste beteiligt (Jakubke & Jeschkeit 1987). Der größte Teil des Wasserstoffs liegt gebunden in Form von Wasser, Säuren, Basen und organischen Verbindungen vor. Molekularer Wasserstoff ist dagegen nur in Spuren im Boden, in der Atmosphäre und in vulkanischen Gasen anzutreffen. Dennoch spielt der molekulare Wasserstoff eine herausragende Rolle im Stoffwechsel von Mikroorganismen. Zu Beginn des vergangenen Jahrhunderts wurde beschrieben, dass Bakterien in der Lage sind, H_2 zu bilden und zu verbrauchen (Stephenson & Stickland 1931). Diese Fähigkeiten wurden dem Enzym Hydrogenase zugeschrieben (Stephenson & Stickland 1931). Systematische Untersuchungen haben ergeben, dass Hydrogenasen vor allem bei Vertretern aus den Organismendomänen Archaea und Bacteria vorkommen. Auch bei einigen niederen Eukaryoten, wie z.B. Pilzen, Algen und Protozoen sind sie existent (Vignais *et al.* 2001, Schwartz & Friedrich 2003, Vignais & Colbeau 2004). Hydrogenasen katalysieren die reversible Spaltung von H_2 entsprechend der Gleichung:



So wie die phylogenetische Verbreitung, ist auch die physiologische Funktion der Hydrogenasen unterschiedlich (Vignais *et al.* 2001, Schwartz & Friedrich 2003, Vignais & Colbeau 2004). Die biologische Freisetzung von H_2 erfolgt unter strikt anaeroben Bedingungen beim Vergären von organischen Verbindungen durch so genannte „Abgabe“-Hydrogenasen. So reoxidieren z.B. Clostridien und Enterobakterien ihre überschüssigen Reduktionsäquivalente und setzen den dabei entstehenden H_2 über ihre Hydrogenasen frei (Joyner *et al.* 1977, Adams *et al.* 1981, Sawers 1994).

Die Oxidation von H_2 wird durch so genannte „Aufnahme“-Hydrogenasen katalysiert. Die bei dieser Reaktion frei werdenden Elektronen werden unter anaeroben Bedingungen zur Reduktion von Sulfat, Schwefel, Nitrat, Eisen(III)-Ionen, Fumarat oder Kohlendioxid verwendet. Desulfurikanten, wie z.B. *Desulfovibrio gigas*, gehören zu den bekanntesten und am besten untersuchten anaeroben H_2 -Oxidierern (Voordouw 1990, Hatchikian *et al.* 1978). Aber auch Denitrifikanten, wie *Paracoccus denitrificans*, sowie

acetogene Bakterien, einige phototrophe Bakterien und methanogene Archaea sind in der Lage, bei Abwesenheit von Sauerstoff Wasserstoff zu verwerten (Strohm *et al.* 2007, Krzycki & Zeikus 1984, Leclerc *et al.* 1997, Gogotov 1986, Shima *et al.* 2002). In den methanogenen Organismen werden die bei der H₂-Spaltung entstehenden Elektronen auf Kohlendioxid übertragen.

So genannte Knallgasbakterien sind in der Lage, autotroph zu wachsen und unter aeroben Bedingungen O₂ mit Hilfe von H₂ zu reduzieren (Schlegel & Schneider 1985), wobei u.a. Reduktionsäquivalente und ATP für die CO₂-Fixierung entstehen. Zu der Gruppe der Knallgasbakterien gehören u.a. Vertreter der Gattungen: *Alcaligenes*, *Aquifex*, *Ralstonia*, *Paracoccus*, *Pseudomonas*, *Hydrogenovibrio*, *Helicobacter* und *Rhodococcus* (Vignais *et al.* 2001, Schwartz & Friedrich 2003). Hydrogenasen kommen auch in einer großen Anzahl von stickstofffixierenden Bodenbakterien vor. Einige bekannte und gut untersuchte Vertreter sind z.B. *Bradyrhizobium japonicum*, *Azotobacter vinelandii* und *Rhizobium leguminosarum* (Evans *et al.* 1987, Vignais *et al.* 2001). Bei der N₂-Fixierung wird durch das Enzym Nitrogenase in einer Nebenreaktion molekularer Wasserstoff produziert. Die Gesamtreaktion zur N₂-Fixierung ist sehr energieaufwendig. In einigen Organismen kann der entstandene H₂ über eine „Aufnahme“-Hydrogenase reoxidiert werden. Durch diese Reoxidation wird ein Teil der aufgewendeten Energie zurück gewonnen (Dixon 1978, Mortenson 1978).

Eine Vielzahl phototropher Bakterien ist ebenfalls im Besitz von Hydrogenasen. In dem Proteobakterium *Thiocapsa roseopersicina* sind bisher fünf verschiedene [NiFe]-Hydrogenasen identifiziert worden (Kovács & Rákhely 2007). Die HynSL-Hydrogenase ist an die photosynthetische Membran gebunden und speist wahrscheinlich das Photosystem mit Elektronen (Zorin *et al.* 1996). In Cyanobakterien und einigen eukaryotischen Algen stehen Hydrogenasen möglicherweise mit der Atmung oder der Photoreduktion in Verbindung (Kessler 1973, Appel & Schulz 1998).

1.2 Klassifizierung der Hydrogenasen

An Hand des Metallgehalts lassen sich die Hydrogenasen in drei Gruppen einteilen. Neben den so genannten Mono-[Fe]-Hydrogenasen gibt es die Gruppe der [FeFe]-Hydrogenasen und die große Gruppe der [NiFe]-Hydrogenasen (Vignais & Colbeau 2004).

Die [Fe]-Hydrogenasen (früher als „metallfreie“-Hydrogenasen bezeichnet) ermöglichen einigen methanogenen Archaea das Wachstum in Gegenwart von H_2 und CO_2 . Sie katalysieren die reversible Reaktion von N_5,N_{10} -Methenyltetrahydromethanopterin mit H_2 zu N_5,N_{10} -Methylenetetrahydromethanopterin, einem Zwischenschritt der Methansynthese aus CO_2 und H_2 . Sie unterscheiden sich von den anderen Hydrogenasegruppen, da sie keine FeS-Cluster besitzen (Abb. 1). In der [Fe]-Hydrogenase von *Methanothermobacter marburgiensis* konnte redox-inaktives Fe identifiziert werden, welches mit einem noch nicht näher charakterisierten organischen Kofaktor assoziiert zu sein scheint (Buurmann *et al.* 2000, Lyon *et al.* 2004, Shima *et al.* 2004, Shima *et al.* 2005, Korbass *et al.* 2006, Shima & Thauer 2007).

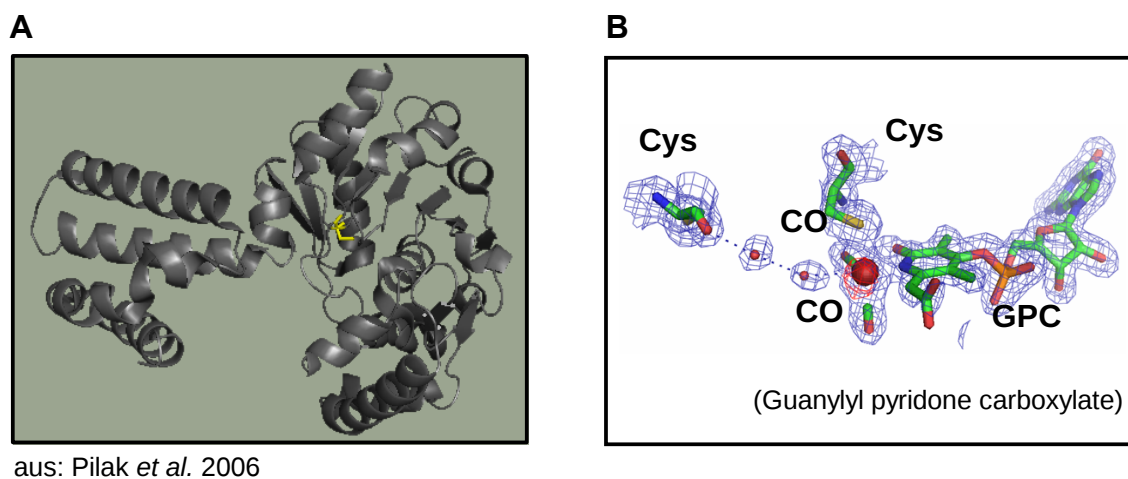
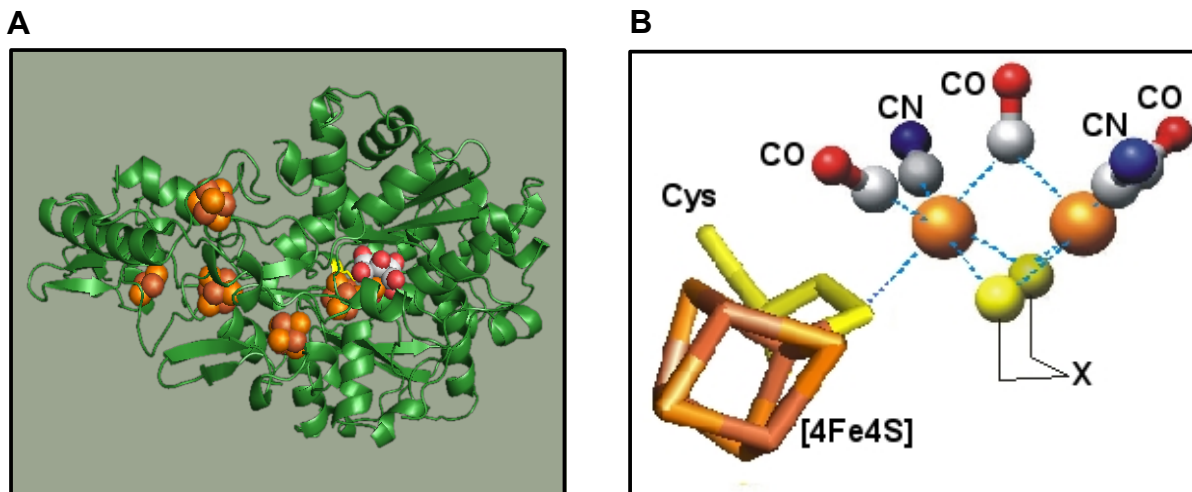


Abb. 1: (A) Strukturmodell des Apoenzyms der [Fe]-Hydrogenase (Hmd) von *Methanocaldococcus jannaschii*. Der Fe-haltige Kofaktor ist gelb hervorgehoben. (B) Modell des Fe-haltigen Kofaktors. Das Fe-Atom ist als rote Kugel abgebildet.

Das Vorkommen der [FeFe]-Hydrogenasen (früher als Fe-only Hydrogenasen bezeichnet) begrenzt sich auf anaerobe Bakterien, wie z.B. *Clostridium* und *Desulfovibrio*. Einige Grünalgen, wie z.B. *Chlamydomonas* und verschiedene eukaryotische Protozoen mit Hydrogenosomen, wie *Trichomonas* besitzen auch dieses Enzym (Posewitz *et al.* 2005, Bui & Johnson 1996, Vignais *et al.* 2001). Die [FeFe]-Hydrogenasen, bei denen es sich um „Abgabe“-Hydrogenasen handelt, sind oft Monomere. Sie bestehen aus der den so genannten H-Cluster enthaltenden Untereinheit, der das katalytische Zentrum bildet (Adams 1990). Der H-Cluster besteht aus einem H_2 -aktivierenden $[2Fe-2S]$ -Zentrum und einem $[4Fe-4S]$ -Zentrum (Abb. 2), die über ein Schwefelatom eines Cysteinrestes miteinander verbunden sind (Peters *et al.* 1998, Nicolet *et al.* 1999). An die Eisenatome des $[2Fe]$ -Zentrums ist neben den diatomaren Liganden CO und CN^- (Pierik *et al.* 1998a) auch eine verbrückende

organische Gruppe gebunden. Dieser Brückenligand wird als ein Dithiol-Rest beschrieben (Nicolet *et al.* 2001, Zilberman *et al.* 2007). Neben der katalytischen Untereinheit enthalten einige [FeFe]-Hydrogenasen zusätzlich FeS-Zentren tragende Domänen, die für den Elektronentransport zu den Elektronenakzeptoren notwendig sind (Peters *et al.* 1998, Nicolet *et al.* 1999, Vignais *et al.* 2001, Vignais & Colbeau 2004).

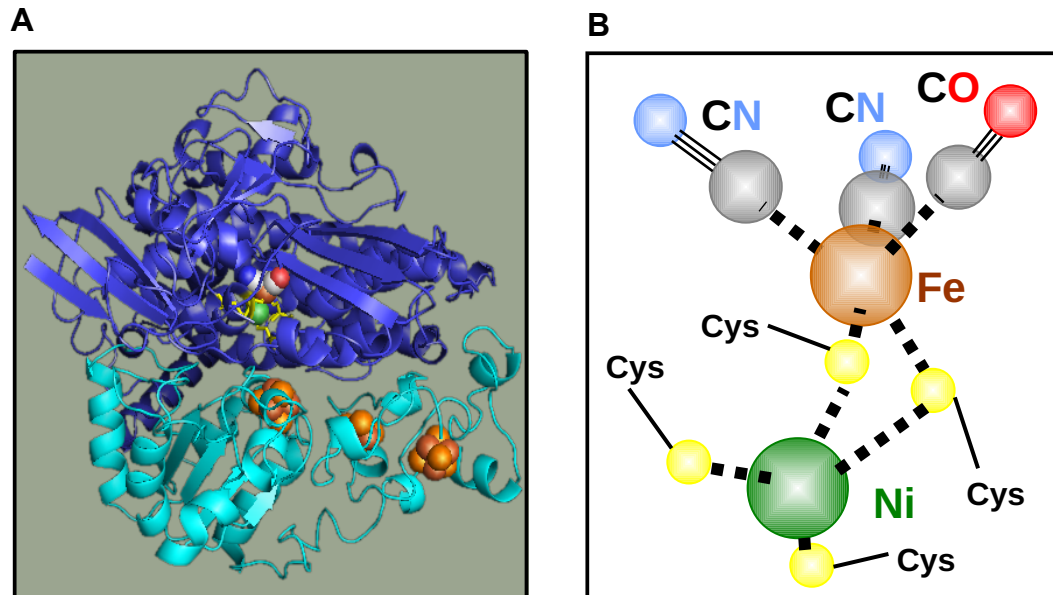


aus: Peters *et al.* 1998

Abb. 2: (A) Strukturmodell der [FeFe]-Hydrogenase (Cpl) von *Clostridium pasteurianum*. Orange/braune Kugeln stellen die FeS-Zentren dar. Grau/rote Kugeln symbolisieren die diatomaren Fe-Liganden. (B) Nahansicht des so genannten H-Clusters. Die Fe-Atome sind als orangefarbene Kugeln abgebildet. Gelbe Kugeln symbolisieren die Schwefelatome des [2Fe-2S]-Zentrums. Die CN-Liganden sind grau/blau und die CO-Liganden grau/rot dargestellt.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit [NiFe]-Hydrogenasen, bei denen es sich physiologisch um „Aufnahme“-Hydrogenasen handelt. [NiFe]-Hydrogenasen sind unter einer Vielzahl anaerober und fakultativ anaerober Archaea und Bacteria verbreitet. Die ersten Ni-haltigen Hydrogenasen wurden als Heterodimer mit einer großen und einer kleinen Untereinheit isoliert, deren Größen ungefähr 60 und 30 kDa betragen (Schneider & Schlegel 1976, Schink & Schlegel 1979) und die über eine große Kontaktfläche miteinander interagieren (Volbeda *et al.* 1995, Higuchi *et al.* 1997). Eingebettet in die große Untereinheit liegt das aktive Zentrum (Abb. 3 B). Die kleine Untereinheit enthält bis zu drei FeS-Zentren, die eine Weiterleitung der Elektronen vom aktiven Zentrum hin zu den Elektronenakzeptoren bzw. -donoren vermitteln (Abb. 3 A), wobei das proximale [4Fe-4S]-Zentrum essentiell für die Spaltung des H_2 ist (Albracht 1994, Volbeda *et al.* 1995, Fontecilla-Camps *et al.* 1997). Durch die große Untereinheit erstreckt sich ein hydrophober Kanal, der das aktive Zentrum mit der Proteinoberfläche verbindet und somit die Gasdiffusion zum katalytischen Zentrum

ermöglicht (Fontecilla-Camps *et al.* 1997, Montet *et al.* 1997). In Abhängigkeit von ihrer physiologischen Funktion und von strukturellen Unterschieden lassen sich die [NiFe]-Hydrogenasen wiederum in vier Gruppen unterteilen (Vignais *et al.* 2001).



aus: Volbeda *et al.* 1995

Abb. 3: (A) Strukturmodell der [NiFe]-Hydrogenase von *Desulfovibrio gigas*. Die große, das aktive Zentrum tragende Untereinheit ist dunkelblau, die kleine Untereinheit hellblau dargestellt. Orange/braune Kugeln symbolisieren die FeS-Zentren. Nickel ist grün und Fe orange abgebildet. Die diatomaren Fe-Liganden sind grau/blau bzw. grau/rot dargestellt. (B) Modell des aktiven Zentrums. Die Metallatome des [NiFe]-Zentrums sind als grüne und orangefarbene Kugel abgebildet. Gelbe Kugeln kennzeichnen die S-Atome der Cysteine. Die diatomaren Fe-Liganden sind grau/blau und grau/rot hervorgehoben.

Die erste Gruppe wird von den membrangebundenen und den periplasmatischen H_2 -oxidierenden [NiFe]-Hydrogenasen gebildet, die als so genannte Standard-Hydrogenasen bezeichnet werden und ein Wachstum mit H_2 als Energiequelle ermöglichen. Die membrangebundenen Hydrogenasen besitzen neben dem Hydrogenasedimer als primären Elektronenakzeptor ein *b*-Typ-Cytochrom, das gleichzeitig als Redox-Überträger und Membrananker dient (Cauvin *et al.* 1991, Bernhard *et al.* 1997, Meek & Arp 2000, Vignais & Colbeau 2004). Bei den sulfatreduzierenden Bakterien stellt dieser Elektronenakzeptor ein *c*-Typ-Cytochrom dar (Bianco *et al.* 1992, Aubert *et al.* 2000, Morelli *et al.* 2000, Vignais & Colbeau 2004). Die Cytochrome mit unterschiedlichen Potentialen übertragen die Elektronen vom aktiven Zentrum an einen Chinon-Pool, von dem sie dann an die jeweiligen Elektronenakzeptoren, wie z.B. O_2 , NO_3^- , SO_4^{2-} , CO_2 oder Fumarat weitergeleitet werden.

Die zweite Gruppe bilden die cytoplasmatischen heterodimeren [NiFe]-Hydrogenasen. Die cyanobakteriellen „Aufnahme“-Hydrogenasen (Tamagnini *et al.* 2002) werden während der N₂-Fixierung gebildet. Die H₂-sensierenden Hydrogenasen in *Bradyrhizobium japonicum* (Black *et al.* 1994), *Rhodobacter capsulatus* (Elsen *et al.* 1996) und *Ralstonia eutropha* (Lenz *et al.* 1997, Kleihues *et al.* 2000) sind cytoplasmatische, lösliche Proteine, die nicht direkt an der Energiegewinnung beteiligt sind und bilden eine Untergruppe. Sie detektieren den Wasserstoff in der Umgebung und initiieren eine Kaskade zellulärer Reaktionen, die die Synthese respiratorischer [NiFe]-Hydrogenasen kontrolliert.

Der dritten Gruppe gehören die cytoplasmatischen heteromultimeren [NiFe]-Hydrogenasen an, die Untereinheiten enthalten, welche reversibel lösliche Kofaktoren, wie z.B. F₄₂₀, NAD oder NADP, binden können und für die Bildung von Reduktionsäquivalenten verantwortlich sind (Ma *et al.* 1994, Thauer *et al.* 1996, Burgdorf *et al.* 2005c, Vignais *et al.* 2001). Die Anzahl der Untereinheiten variiert zwischen drei, wie im Fall der F₄₂₀-reduzierenden Hydrogenasen, und vier, wie bei den NAD(P)-reduzierenden Hydrogenasen. Die ursprünglich als Tetramere angenommenen Enzyme, bei denen es sich nach neueren Beobachtungen um Penta- und Hexamere handelt, lassen sich in ein Hydrogenasemodul und ein Diaphorasemodul einteilen. Im Hydrogenasedimer erfolgt die H₂-Spaltung. Über FeS-Zentren, die in den kleinen Untereinheiten der beiden Module lokalisiert sind, werden die Elektronen vom aktiven Zentrum hin zur NAD(P)-Bindestelle im Diaphorasemodul transportiert (Vignais *et al.* 2001, van der Linden *et al.* 2004b, Rákhely *et al.* 2004, Burgdorf *et al.* 2005c).

Membranassoziierte „Bildungs“-Hydrogenasen werden in der vierten Gruppe zusammengefasst. Ein sehr gut untersuchtes Protein dieser Gruppe ist die Hydrogenase 3 aus *Escherichia coli*, die Teil des Formiat-Lyase-Komplexes ist und nur unter strikt anaeroben Bedingungen gebildet wird (Böhm *et al.* 1990, Sauter *et al.* 1992). Die CO-induzierte Hydrogenase von *Rhodospirillum rubrum* gehört ebenfalls in diese Gruppe und ist Teil des CO-oxidierenden Systems, welches diesen Bakterien ermöglicht, ohne Licht in Gegenwart von CO zu wachsen (Fox *et al.* 1996). Der *E. coli*-Hydrogenase 3 ähnliche Hydrogenasen wurden auch in einigen Archaeen, z.B. in *Methanosarcina barkeri* (Kunkel *et al.* 1998) und *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Tersteegen & Hedderich 1999) gefunden. Die bisher verfügbaren Hydrogenasesequenzen weisen darauf hin, dass in den kleinen Untereinheiten nicht drei FeS-Cluster, wie in den Standard-Hydrogenasen, sondern nur ein FeS-Cluster vorhanden ist (Vignais *et al.* 2001).

1.3 Struktur und Katalyse von [NiFe]-Hydrogenasen

Die erste Röntgenstrukturanalyse einer [NiFe]-Hydrogenase gelang an dem dimeren, periplasmatischen Enzym von *Desulfovibrio gigas* (Volbeda *et al.* 1995). Über eine große Kontaktfläche stehen die große und die kleine Untereinheit miteinander in Verbindung und bilden ein Heterodimer. Das Nickelatom ist tief in die große Untereinheit eingebettet. Als weiteres Metall konnte Eisen in der Entfernung von 2.8 Å vom Ni identifiziert werden. Zwei Cysteine im N-Terminus und zwei weitere Cysteine im C-Terminus der großen Untereinheit koordinieren das Nickel (Abb. 4A), wobei die jeweils zweiten Cysteine beider Paare verbrückende Liganden darstellen, die neben dem Nickel auch das Eisen koordinieren (Volbeda *et al.* 2005).

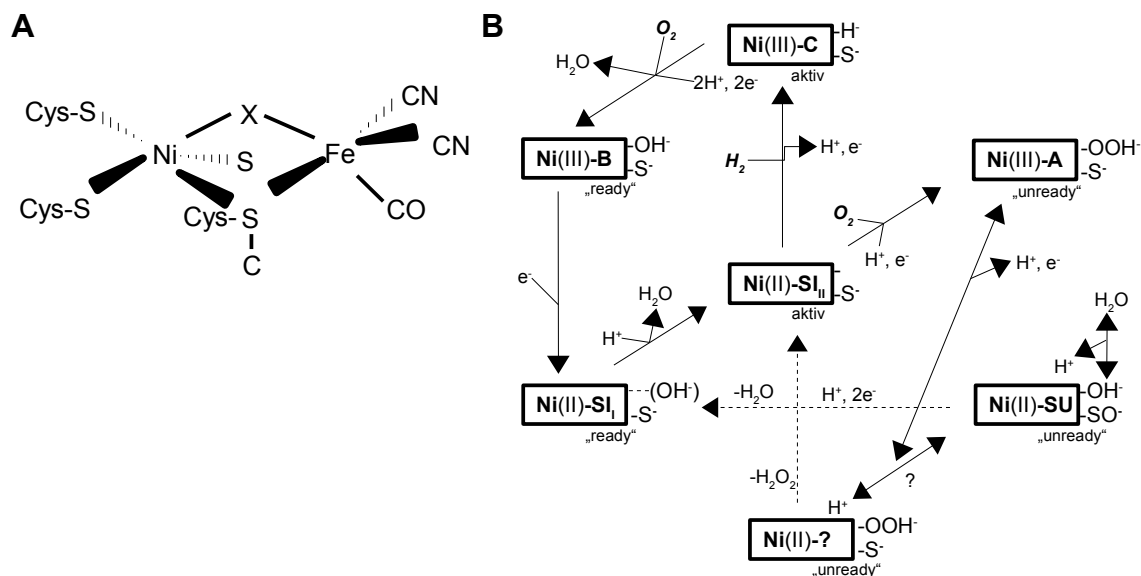


Abb. 4: (A) Schematische Darstellung des aktiven Zentrums einer inaktiven [NiFe]-Hydrogenase, beruhend auf Röntgenstruktur- und FTIR-Daten. (B) Redox-Zustände des aktiven Zentrums von Standard-[NiFe]-Hydrogenasen. (A und B nach Volbeda *et al.* 2005).

Das bimetallische Zentrum wird in Abhängigkeit seines Redox-Zustands durch einen weiteren Liganden verbrückt, der unter reduzierenden Bedingungen entfernt werden kann. Für die *D. gigas*-Hydrogenase wurde gezeigt, dass sich im oxidierten Zustand wahrscheinlich eine Sauerstoffspezies (OOH⁻ bzw. OH⁻) in der Brückenposition befindet, die dann während der Katalyse im reduzierten Enzym durch H⁺ ersetzt wird (Albracht 1994, Bleijlevens *et al.* 2001, Carepo *et al.* 2002, Brecht *et al.* 2003, Volbeda *et al.* 2005). Am Eisenatom konnten drei diatomare Liganden identifiziert werden. Fourier-Transformations-Infrarot (FTIR)-spektroskopische und chemische Untersuchungen haben ergeben, dass es sich bei diesen Molekülen um eine CO- und zwei CN⁻-Gruppen handelt (Happe *et al.* 1997, Pierik *et al.* 1999). Die kleine

Hydrogenase-Untereinheit enthält drei linear angeordnete FeS-Cluster, die den Elektronentransfer vom katalytischen Zentrum zum distalen Cluster und umgekehrt katalysieren.

Bisher gelangen Röntgenstrukturanalysen an den [NiFe]-Hydrogenasen von *D. gigas*, *D. fructosovorans*, *D. vulgaris* Mizazaki F und *D. desulfuricans* sowie an der [NiFeSe]-Hydrogenase von *Desulfomicrobium baculatum* mit einer Auflösung von 1.4 bis 2.7 Å. Es handelt sich dabei ausschließlich um anaerobe Organismen (Volbeda *et al.* 1995, Montet *et al.* 1997, Higuchi *et al.* 1999, Garcin *et al.* 1999, Matias *et al.* 2001).

Derzeit ist der Mechanismus der H₂-Oxidation noch nicht eindeutig verstanden. Elektronenspinresonanz (EPR)- und FTIR-spektroskopische Untersuchungen an [NiFe]-Hydrogenasen brachten erste Aufschlüsse über verschiedene Redox-Zustände des aktiven Zentrums (Albracht 1994, Maroney & Bryngelson 2001). Es wird davon ausgegangen, dass das Eisen im [NiFe]-Zentrum als sogenanntes „low spin“-Fe²⁺ während des gesamten Katalysedurchlaufs vorliegt. Die diatomaren CO- und CN⁻-Liganden scheinen dafür verantwortlich zu sein, dass das Eisen in seinem Redox-Zustand verbleibt. Im Gegensatz dazu durchläuft das Nickelatom während der Katalyse verschiedene Redox-Zustände, die in der Abbildung 4 B dargestellt sind. Als Oxidationszustände werden Ni(I), Ni(II) und Ni(III) angenommen. Im oxidierten Zustand lassen sich zwei katalytisch inaktive Formen mit unterschiedlichen EPR-Signalen: Ni-A („unready“, inaktiv) und Ni-B („ready“, inaktiv) unterscheiden. In Gegenwart von Wasserstoff werden die oxidierten Enzyme aktiviert, und es kommt zunächst zur Bildung eines EPR-insensitiven Zustands, der als Ni-S („silent“) bezeichnet wird. Dieser Zustand wird mit dem Abdissoziieren der Sauerstoffspezies vom [NiFe]-Zentrum erklärt. Letztendlich geht das Enzym in den aktiven Ni-C-Zustand über, in dem ein Hydrid-Ion an das [NiFe]-Zentrum gebunden ist (Brecht *et al.* 2003, Foerster *et al.* 2005). Die Ni-B-Form wechselt innerhalb weniger Minuten in den Ni-C Zustand, wohingegen die Ni-A-Form erst nach langer, teilweise Stunden dauernder Inkubation mit H₂, in den aktiven Zustand übergeht. Eine weitere Reduktion des Ni-C-Zustands führt zu einer EPR-insensitiven Ni-R-Form. Während der heterolytischen H₂-Spaltung fungiert eines der vier konservierten Cysteine vermutlich als katalytische Base und nimmt ein Proton auf. Das Hydrid bindet am [NiFe]-Zentrum und zwei Elektronen werden nacheinander auf die FeS-Cluster übertragen. Gleichzeitig werden die entstandenen Protonen über Aminosäurereste aus dem Zentrum an die Proteinoberfläche geleitet. Der Ni-C-Zustand ist photosensitiv und lässt sich leicht durch starkes Belichten bei Temperaturen

unterhalb von 80 K in den Ni-L-Zustand überführen (Medina *et al.* 1996, Siegbahn *et al.* 2001). Dieser Vorgang ist reversibel und ohne Bedeutung für den Katalysemechanismus.

1.4 Maturation der Hydrogenasen

Molekularbiologische Experimente an verschiedenen Organismen haben gezeigt, dass spezielle Hilfsproteine an der Biosynthese aktiver Hydrogenasen beteiligt sind. Die Maturation der [FeFe]-Hydrogenasen ist abhängig von mindestens drei Hilfsproteinen. Zwei dieser Proteine gehören in die Klasse der Radical-S-Adenosyl-Metheonin(SAM)-Enzyme und das dritte wird der Familie der GTPasen zugeordnet (Posewitz *et al.* 2004, Böck *et al.* 2006, Peters *et al.* 2006). Für die Biosynthese der [NiFe]-Hydrogenasen sind die sechs akzessorischen Genprodukte HypA, HypB, HypC, HypD, HypE und HypF essentiell. Die Gene dieser Proteine liegen oft in unmittelbarer Nachbarschaft zu den Strukturgenen (Friedrich & Schwartz 1993, Vignais & Toussaint 1994, Maier & Böck 1996b, Schwartz & Friedrich 2003). Mutationen in den akzessorischen Proteinen wirken sich nicht auf die Biosynthese der Untereinheiten aus, die durch die Strukturgene kodiert werden, vielmehr bewirken sie eine Blockade der Synthese des aktiven Enzyms (Jacobi *et al.* 1992, Dornedde *et al.* 1996, Wolf *et al.* 1998). Einige Organismen besitzen noch ein HypX, das benötigt wird für die Bildung von energiegekoppelten Hydrogenasen unter aeroben Bedingungen (Rey *et al.* 1996, Durmowicz & Maier 1997, Buhrke & Friedrich 1998). Die Assemblierung des [NiFe]-Zentrums wurde bisher sehr intensiv an der Hydrogenase 3 von *E. coli* untersucht und ist schematisch in der Abbildung 5 dargestellt (Blokesch *et al.* 2002b, Böck *et al.* 2006).

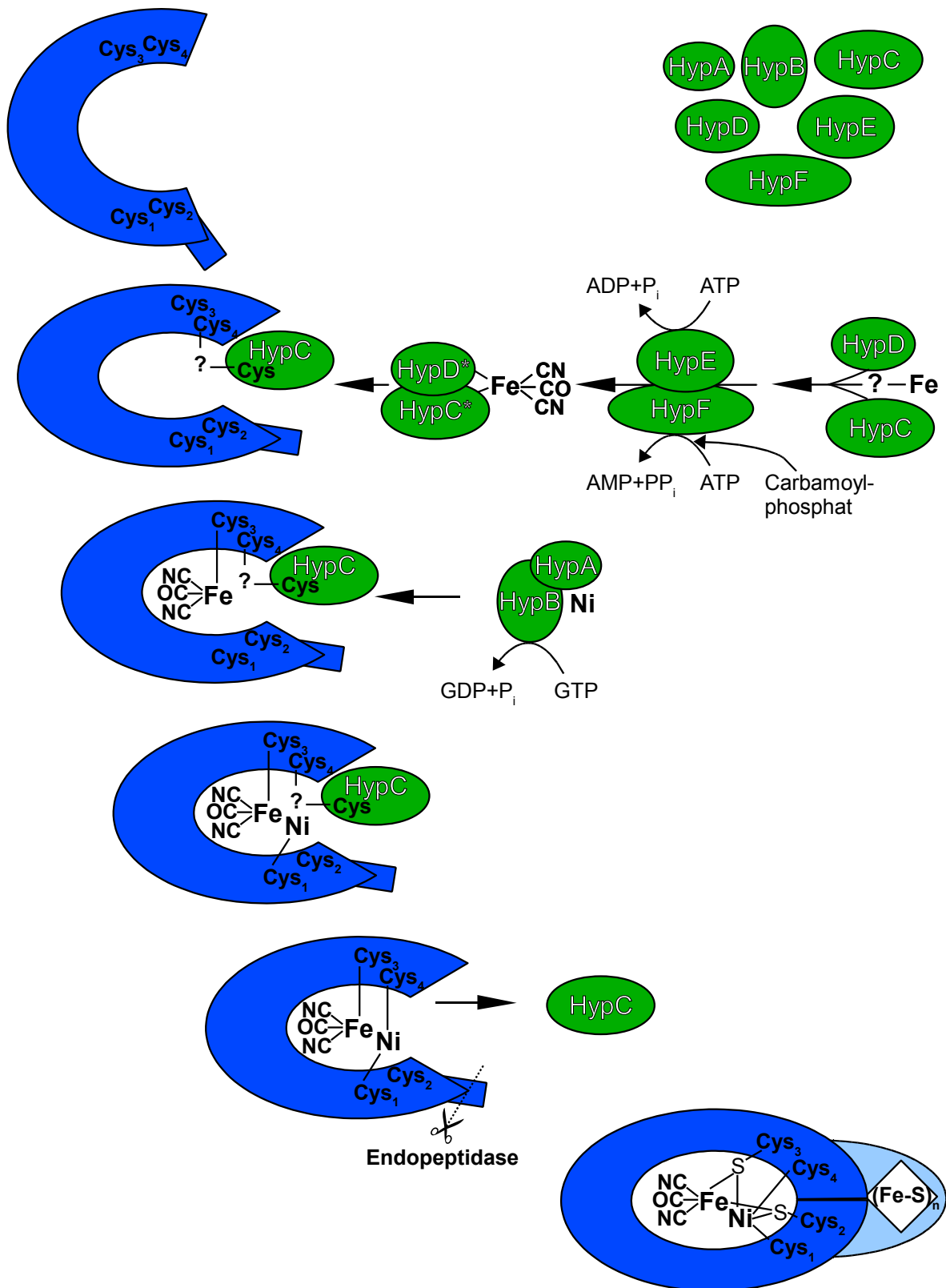


Abb. 5: Hypothetische Maturation des [NiFe]-Zentrums der großen Untereinheit von [NiFe]-Hydrogenasen, vermittelt durch die Hyp-Proteine. Konservierte Cysteine: Cys1, C-terminales Ni-bindendes Cystein; Cys2, C-terminales, verbrückendes Cystein; Cys3, N-terminales Ni und Fe verbindendes Cystein; Cys4, N-terminales Ni-bindendes Cystein. (Abb. verändert nach Blokesch *et al.* 2002a)

Eine der wichtigsten Fragen bei der Maturation der [NiFe]-Hydrogenasen ist die nach der Synthese der drei diatomaren Nichtproteinliganden am Eisenatom. CO und CN⁻ sind hochtoxische Verbindungen, die vermutlich nicht frei in der Zelle synthetisiert werden. Das akzessorische HypF trägt unter anderem ein Sequenzmotiv, welches Ähnlichkeit mit einem Motiv der O-Carbamoyltransferase hat. Ausgehend von diesem Befund war es möglich, Carbamoylphosphat (CP) als Edukt für die Synthese von CN⁻ nachzuweisen (Paschos *et al.* 2001, Forzi *et al.* 2007, Lenz *et al.* 2007). Es wird angenommen, dass die Umwandlung von CP zu CN⁻ eine ATP-abhängige Dehydratisierung ist (Paschos *et al.* 2002). HypF bildet mit HypE einen Komplex (Abb. 5), der dann die ATP-Hydrolyse katalysiert (Reissmann *et al.* 2003). HypC hat mehrere Funktionen. Zum einen bildet es einen Komplex mit HypD, der als Intermediat dient, an dem die CN⁻-Ligandierung des Eisens erfolgt (Blokesch & Böck 2002). Zum anderen geht HypC auch eine Verbindung mit der Vorläuferform der großen Hydrogenase-Untereinheit preHycE ein, die eine C-terminale Extension von 32 Aminosäuren trägt. Der Transport von ligandiertem Eisen vom HypC/HypD-Komplex zum preHycE wird HypC zugeschrieben. Der Eiseneinbau in die große HycE-Untereinheit von *E. coli* erfolgt vor dem Nickeleinbau und unabhängig davon (Blokesch *et al.* 2002b, Böck *et al.* 2006). Experimentell wurde das an der H₂-sensierenden [NiFe]-Hydrogenase von *R. eutropha* gezeigt (Winter *et al.* 2005). Die Funktionen von HypA und HypB bestehen vermutlich in der Kontrolle der Nickelinsertion und deren Unterstützung. Die Aktivitäten beider Proteine können durch hohe Nickelkonzentrationen komplementiert werden (Waugh & Boxer 1986, Jacobi *et al.* 1992, Rey *et al.* 1994, Fu *et al.* 1995, Maier & Böck 1996a, Olson *et al.* 2001, Hube *et al.* 2002, Blokesch *et al.* 2004). HypB bindet GTP, dessen Hydrolyse Voraussetzung für den Ni-Einbau ist. HypB-Proteine, die N-terminal ein Histidin-reiches Segment enthalten, die so genannten His-Stretches, haben zwei Funktionen (Olson & Maier 2000). Sie dienen einerseits als Ni-Speicher und hydrolysieren andererseits GTP für die Maturation. HypB von *E. coli* besitzt keinen Poly-Ni-Stretch. Die Metallbindung erfolgt hier an einer Peptidylprolyl-Isomerase (SlyD), die bei der Maturation einen Komplex mit HypB bildet (Leach *et al.* 2007). Vermutlich dient bei dem Reifungsprozess HypA entweder selbst als Nickeldonor oder es geleitet den Ni-Donor zum preHycE (Böck *et al.* 2006). Die Nickelinsertion erfolgt am preHycE/HypC-Komplex. Der finale Schritt in der Maturation ist die proteolytische Abspaltung der C-terminalen Extension der großen Untereinheit durch Hydrogenase-spezifische Endopeptidasen (Menon *et al.* 1993, Rossmann *et al.* 1994, Thiernemann *et al.* 1996). An Hand der gereinigten metallfreien Endopeptidase Hycl von *E. coli* konnte gezeigt

werden, dass preHycE nur hydrolysiert wird, wenn der Nickeleinbau erfolgt war (Fritsche *et al.* 1999, Theodoratou *et al.* 2005). Nach erfolgreicher Abspaltung der C-terminalen Extension durch die spezifische Endopeptidase können die Untereinheiten oligomerisieren.

Für das Knallgasbakterium *Ralstonia eutropha* wurde ebenfalls ein Komplex aus HypC und HypD experimentell nachgewiesen, der mit HypE interagieren kann und unterschiedliche HypC/HypD/HypE-Komplexe formt (Jones *et al.* 2004). Die Bildung stabiler Komplexe aus den drei Proteinen scheint abhängig von der Präsenz des Proteins HypF1 zu sein, einer verkürzten, nur das C-terminale Motiv tragende Version des HypF-Proteins. Neben HypF1 besitzt *R. eutropha* noch ein HypF2-Protein, welches einem Standard-HypF entspricht und drei stark konservierte Sequenzmotive enthält, ein N-terminales Acyl-Phosphatase-Motiv, zwei Zinkfinger-Motive und das C-terminale Motiv mit drei konservierten Histidin-Resten (Paschos *et al.* 2002, Wolf *et al.* 1998). In *Thiocapsa roseopersicina* liegen wiederum zwei HypC-Proteine vor, die notwendig sind für die Maturation der [NiFe]-Hydrogenasen. HypC1 und HypC2 sind pleiotrope akzessorische Proteine (Maroti *et al.* 2003), die während der Maturation einander ersetzen können. Es wird angenommen, dass HypC mit HypD interagiert, während ein anderes HypC die unprozessierte große Hydrogenase-Untereinheit in einer offenen Konformation hält.

Periplasmatische und membranständige Hydrogenasen müssen im Anschluss an den Kofaktoreinbau noch durch die Cytoplasmamembran transportiert werden. Die Hydrogenasen werden zunächst vollständig assembliert und dann über den TAT-Apparat ins Periplasma transferiert (Bernhard *et al.* 2000, Dubini & Sargent 2003, Jack *et al.* 2004, Jack *et al.* 2005, Sargent *et al.* 2006, Schubert *et al.* 2007). Die N-terminalen Aminosäuresequenzen der kleinen Untereinheiten periplasmatischer und membrangebundener Hydrogenasen weisen das charakteristische „twin-arginine“-Sequenzmotiv (RRxFxK) auf, das während des Translokationsprozesses durch den TAT-Apparat erkannt wird (Jack *et al.* 2004, Jack *et al.* 2005).

1.5 Die Hydrogenasen von *Ralstonia eutropha* H16

Das Knallgasbakterium *Ralstonia eutropha* H16 dient als Modellorganismus für Untersuchungen zur Funktion, Struktur, Maturation und Regulation von aeroben [NiFe]-Hydrogenasen. Diese Proteine zeichnen sich durch eine hohe Toleranz gegenüber Sauerstoff aus. Anders als bei den Standard-[NiFe]-Hydrogenasen, wird

ihre Aktivität nicht oder nur geringfügig durch O_2 inaktiviert (Burgdorf *et al.* 2005a). *R. eutropha* gehört der Gruppe der β -Proteobakterien an und ist in der Lage, die Energiegewinnung aus Wasserstoff mit der Fixierung von CO_2 über den Calvin-Benson-Bassham-Zyklus zu koppeln (Kusian & Bowien 1997). Als strikt respiratorischer Organismus kann *R. eutropha* unter anaeroben Bedingungen nur mit Nitrat als terminalen Elektronenakzeptor wachsen (Pfitzner & Schlegel 1973, Zumft 2002, Schwartz *et al.* 2003). Für die H_2 -Oxidation stehen *R. eutropha* zwei mit dem Energiestoffwechsel gekoppelte [NiFe]-Hydrogenasen zur Verfügung (Abb. 6). (i) Eine membrangebundene Hydrogenase (MBH), die dem Standard-Typ ähnelt und über ein *b*-Typ-Cytochrom in der Cytoplasmamembran verankert ist und in das Periplasma weist (Schink & Schlegel 1979, Bernhard *et al.* 1997) und (ii) eine lösliche FMN-haltige Hydrogenase (SH), die NAD reduziert.

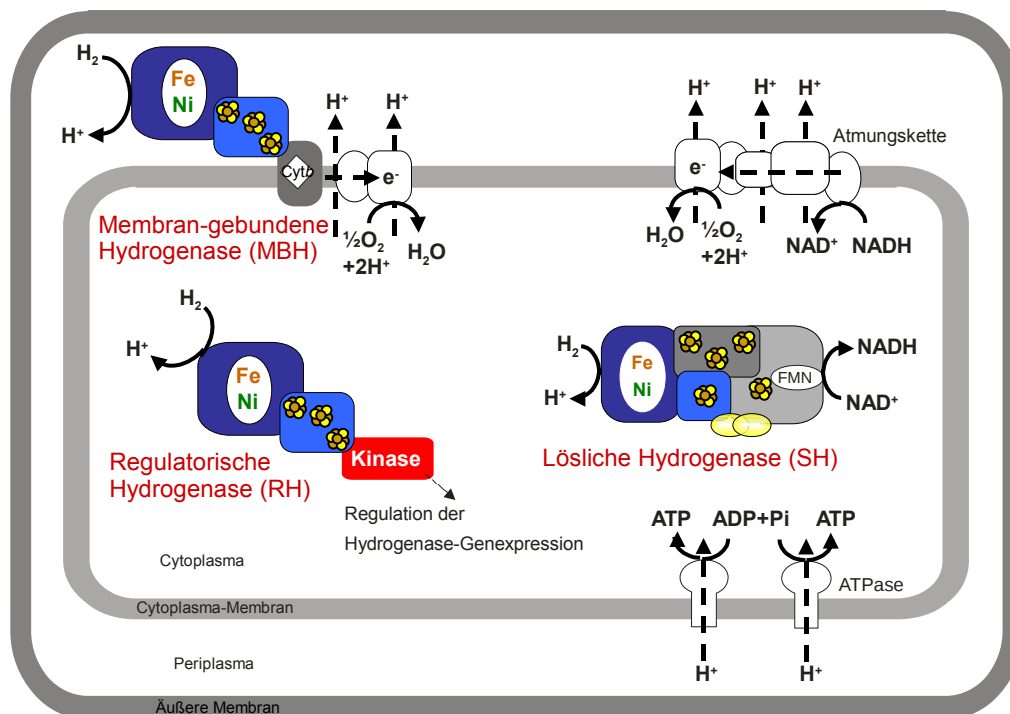


Abb. 6: Die drei [NiFe]-Hydrogenasen von *R. eutropha* H16 (Abb. verändert nach Burgdorf *et al.* 2005a).

Die MBH besteht aus einer großen, das katalytische Zentrum tragenden Untereinheit HoxG und einer kleinen Untereinheit HoxK, die drei FeS-Zentren enthält (Abb. 6). Sie speist Elektronen direkt in die Atmungskette ein (Schink & Schlegel 1979, Bernhard *et al.* 1997).

Die bisher als Tetramer beschriebene cytoplasmatische SH (Schneider & Schlegel 1976, Tran-Betcke *et al.* 1990) ist nach neueren Erkenntnissen ein Komplex, bestehend aus den sechs Untereinheiten HoxFUYH₂ (Burgdorf *et al.* 2005a). Die

Genprodukte HoxH und HoxY bilden ein Hydrogenasedimer. Die verkürzte Aminosäuresequenz der elektronentransferierenden Untereinheit HoxY lässt vermuten, dass das Hydrogenasedimer nur ein einziges FeS-Zentrum enthält (Friedrich *et al.* 1996). HoxF und HoxU fügen sich zu einem Diaphorasedimer zusammen (Abb. 6), das wahrscheinlich vier FeS-Cluster und ein FMN-Molekül enthält (van der Linden *et al.* 2004b). Die Resultate spektroskopischer Untersuchungen an gereinigter SH deuteten auf eine Variation in der Zusammensetzung des aktiven Zentrums hin. Während für Standard-Hydrogenasen drei diatomare Liganden postuliert werden, die an das Eisen des bimetallischen Zentrums gebunden vorliegen (Frey 1998), wird für die SH die Existenz weiterer Liganden angenommen (Happe *et al.* 2000, van der Linden *et al.* 2004a). Das aktive Zentrum der SH von *R. eutropha* wurde als $\text{Ni}(\text{CN}^-)\text{Fe}(\text{CN}^-)_3(\text{CO})$ beschrieben, wonach drei der Cyanide an Fe und das vierte an Ni gebunden vorliegen (Happe *et al.* 2000, van der Linden *et al.* 2004a).

Neben den beiden energiegekoppelten Hydrogenasen besitzt *R. eutropha* noch eine regulatorisch wirkende Hydrogenase (RH), die als H_2 -Sensor fungiert und die Transkription der Hydrogenasegene kontrolliert (Abb. 6) (Lenz 1998). Die Untereinheiten HoxC und HoxB entsprechen auf Grund ihrer Aminosäuresequenzen der großen und der kleinen Untereinheit einer [NiFe]-Hydrogenase. Dennoch unterscheiden sich die Primärsequenzen beider Untereinheiten signifikant von denen so genannter Standard-Hydrogenasen. Sie werden in die Untergruppe 2b der cytoplasmatischen heterodimeren [NiFe]-Hydrogenasen eingeordnet (Vignais *et al.* 2001). Der großen Untereinheit HoxC fehlt die C-terminale Extension, die im Verlauf der Maturation der Standard-Hydrogenasen proteolytisch abgespalten wird (Kleihues *et al.* 2000). Die kleine Untereinheit HoxB trägt N-terminal keine Signalsequenz, die jedoch Voraussetzung für einen Transport über die Cytoplasmamembran wäre. Die strukturellen Besonderheiten der RH werden auch in den H_2 -Sensoren von *Rhodobacter capsulatus* (Elsen *et al.* 1996) und *Bradyrhizobium japonicum* gefunden (Black *et al.* 1994).

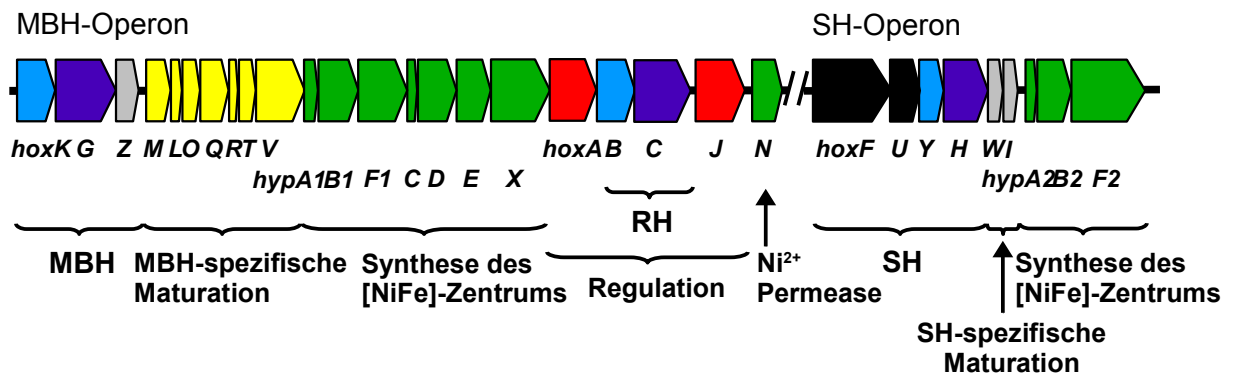


Abb. 7: Die Hydrogenase-Genregion auf dem Megaplasmid pHG1 von *R. eutropha* H16. Die Funktionen der Genprodukte sind im unteren Teil der Abbildung angegeben.

Die *hox*-Gene („hydrogen oxidation“), die die Untereinheiten der MBH, der SH und auch der RH kodieren, sind in zwei voneinander getrennten Transkriptionseinheiten auf dem 450 kb umfassenden Megaplasmid pHG1 lokalisiert (Schwartz *et al.* 2003). Die in der Abbildung 7 schematisch dargestellten Operone bilden ein Regulon (Schwartz *et al.* 1998). Den Strukturgenen der MBH folgt das Gen *hoxZ*, das für ein membranintegrales Cytochrom *b* kodiert (Kortlücke *et al.* 1992, Bernhard *et al.* 1997). Den MBH-Strukturgenen folgen sieben MBH-spezifische akzessorische Gene, deren Genprodukte für die Bildung aktiver korrekt lokalisierter MBH essentiell sind (Bernhard *et al.* 1996, Schubert *et al.* 2007).

In *R. eutropha* liegen die *hyp*-Gene zum Teil dupliziert vor (Dernedde *et al.* 1996, Wolf *et al.* 1998). Mutationen in den *hyp*-Genen führen zur Anhäufung von inaktiven und kofaktorfreen Vorläuferformen der großen Untereinheiten von SH und MBH. *R. eutropha*-Stämme, die eine Einfachmutation in einem der duplizierten *hyp*-Gene tragen, sind noch zu lithoautotrophem Wachstum in der Lage. Doppelmутanten wachsen dagegen unter gleichen Bedingungen nur schwach oder gar nicht (Wolf *et al.* 1998). Die dupliziert vorliegenden Hyp-Proteine scheinen demnach Isoenzyme zu sein, die in der Lage sind, sich physiologisch zu komplementieren (Dernedde *et al.* 1996). Eine Besonderheit in *R. eutropha* ist das Vorhandensein von zwei unterschiedlich großen HypF-Proteinen (Abb. 7). Die sechs akzessorischen Gene *hypABCDEF* konnten in allen Organismen identifiziert werden, die [NiFe]-Hydrogenasen enthalten (Böck *et al.* 2006). Ein weiteres *hyp*-Gen, *hypX* (ehemals *hoxX*), ist im Hydrogenase-Regulon von *R. eutropha* präsent und nur in einigen aeroben Organismen vertreten (Lenz *et al.* 1994). Deletionen des homologen Gens in *Rhizobium leguminosarum* (Rey *et al.* 1996) und *Bradyrhizobium japonicum* (Durmowicz & Maier 1997) führten zur Blockade bzw. Verzögerung der Hydrogenasematuration. Die Nickelversorgung der

Zelle, die für die Bildung aktiver [NiFe]-Hydrogenasen in *R. eutropha* essentiell ist, erfolgt über eine hochaffine Nickel-Permease, die durch *hoxN* kodiert ist (Eitinger & Friedrich 1991).

Stromab- und stromaufwärts der in Abbildung 7 dargestellten RH-Gene *hoxB* und *hoxC* befinden sich Gene, die für eine Histidin-Proteinkinase HoxJ (Lenz & Friedrich 1998) und einen Response-Regulator HoxA kodieren (Eberz & Friedrich 1991). Die Genprodukte sind vergleichbar einem bakteriellen Zweikomponentensystem, das an der Regulation der Hydrogenase-Genexpression beteiligt ist. Diese Regulation erfolgt über eine Signaltransduktionskette, die aus dem Zweikomponentensystem HoxJ/HoxA besteht und zusätzlich die regulatorische Hydrogenase enthält (Lenz *et al.* 1997, Lenz & Friedrich 1998). Insofern handelt es sich um ein nicht-klassisches System. HoxA zählt zu den Response-Regulatoren der NtrC-Familie und interagiert mit einer σ^{54} -abhängigen RNA-Polymerase. HoxA bindet an Enhancer-artigen Elementen in der Promotorregion (Zimmer *et al.* 1995). HoxJ ist eine Histidin-Proteinkinase, die in der Lage ist, HoxA zu phosphorylieren. Bei der Mehrzahl der bislang untersuchten Zweikomponentensysteme werden die Response-Regulatoren durch Phosphorylierung eines hoch konservierten Aspartatrestes im Empfängermodul aktiviert. Dieses führt unmittelbar zur Transkriptionsinitiation der Zielgene (Hoch & Silhavy 1995). Der Phosphatrest wird von einem konservierten Histidinrest im Transmittermodul der Kinase reizabhängig auf den Response-Regulator übertragen. Das konservierte Histidin selbst wird in einer ATP-abhängigen Reaktion autokatalytisch phosphoryliert. Das Ungewöhnliche an dem Zweikomponentensystem HoxJ/HoxA besteht darin, dass sich die Phosphorylierung des Response-Regulators negativ auf die Transkriptionsinitiation der beiden Hydrogenase-Operone auswirkt (Lenz & Friedrich 1998). Alle bisher gewonnenen Daten weisen darauf hin, dass HoxA im phosphorylierten Zustand inaktiv ist und so die Hydrogenase-Genexpression reprimiert wird (Lenz *et al.* 2002). Ob die Gegenwart von H_2 zu einer Hemmung der Kinaseaktivität von HoxJ oder der Aktivierung einer Phosphatase führt, ist bisher nicht geklärt. Die Daten sprechen dafür, dass HoxA bei Anwesenheit von Wasserstoff in seiner nicht-phosphorylierten Form vorliegt und die Transkription des Hydrogenase-Regulons initiiert wird (Lenz *et al.* 2002). Die H_2 -Sensierung erfordert die RH als zusätzliche Komponente. Eine Deletion der RH-Strukturgene führt zu einer dauerhaften Repression des Hydrogenase-Regulons. Deletiert man das Gen für HoxJ, so liegt der Response-Regulator HoxA in nicht-phosphorylierter Form vor und ist somit aktiv (Lenz *et al.* 2002). In einer HoxJ-Mutante kommt es demnach H_2 -unabhängig zur Expression der Hydrogenasegene,

vorausgesetzt, die Zellen befinden sich in einer Energiemangelsituation (Lenz & Friedrich 1998). Ein solcher Zustand wird durch das Kultivieren auf schlecht verwertbaren Kohlenstoffquellen, wie z.B. Glycerin erreicht. Stehen dem Organismus leicht verwertbare Kohlenstoffquellen zur Verfügung, so werden die Hydrogenasegene in *R. eutropha* reprimiert (Friedrich *et al.* 1981, Friedrich 1982, Schwartz *et al.* 1998). Zu den bevorzugten C-Quellen zählen Pyruvat und Succinat. Diese Form der Katabolitkontrolle bei *R. eutropha* ist molekularbiologisch noch nicht aufgeklärt.

Die regulatorische Hydrogenase liegt in der Zelle nur in geringer Konzentration vor und ist durch eine sehr niedrige H_2 -Umsatzrate gekennzeichnet (Pierik *et al.* 1998b, Kleihues *et al.* 2000, Bernhard *et al.* 2001). Im Vergleich dazu liegen die Aktivitäten von MBH und SH um zwei Größenordnungen über der der RH. In der EPR-Analyse ist für die RH nur der EPR-sensitive Zustand Ni-C des reduzierten Enzyms nachweisbar. Die beiden oxidierten Zustände Ni-A und Ni-B der [NiFe]-Hydrogenasen konnten für die RH bisher nicht detektiert werden (Pierik *et al.* 1998b, Bernhard *et al.* 2001). FTIR-spektroskopische Untersuchungen haben gezeigt, dass der NiFe-Kofaktor der RH dem der Standard-Hydrogenasen entspricht. Die Zusammensetzung wurde mit $NiFe(CO)(CN^-)_2$ beschrieben (Pierik *et al.* 1998b, Bernhard *et al.* 2001). Ein weiteres Charakteristikum der RH ist ihre Insensitivität gegenüber O_2 und CO (Pierik *et al.* 1998b, Bernhard *et al.* 2001). Ungewöhnlich ist auch das Verhalten der RH in der D_2/H^+ -Austauschreaktion, die die H_2 -Spaltung am aktiven Zentrum und den Protonentransfer, nicht aber die Reduktion eines Elektronenakzeptors beschreibt. Standard-Hydrogenasen liefern in dieser Reaktion zunächst das Intermediat HD, bevor im weiteren Verlauf der Reaktion H_2 freigesetzt wird. Für die RH konnte bisher ausschließlich die Bildung von H_2 verfolgt werden (Bernhard *et al.* 2001). Möglicherweise ist die Verengung des Gaskanals für die CO- und O_2 -Insensitivität und die Besonderheiten bei der D_2/H^+ -Austauschreaktion verantwortlich (Buhrke 2002, Buhrke *et al.* 2005a). Als weitere Besonderheit des H_2 -Sensors wurde die Existenz eines organischen NAD^+ -ähnlichen Kofaktors angenommen, der bisher nicht weiter charakterisiert wurde (Bernhard *et al.* 2001, Buhrke *et al.* 2004).

1.6 Aufgabenstellung

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, die RH von *R. eutropha* H16 weiter zu charakterisieren, mit dem Ziel, tiefere Einblicke in den Mechanismus der initialen Signalübertragung zu gewinnen. Die besonderen biochemischen und spektroskopischen Eigenschaften der regulatorischen Hydrogenase werfen die Frage

auf, ob die veränderte Proteinumgebung am aktiven Zentrum für die ungewöhnlichen katalytischen Eigenschaften verantwortlich ist. Um diese These zu testen, wurden Punktmutationen in konservierten Bereichen nahe des aktiven Zentrums bzw. an der Kontaktfläche zwischen HoxB und HoxC eingeführt und die Wirkung auf katalytische und regulatorische Eigenschaften untersucht. Für die Röntgenabsorptionsspektroskopie (XAS) wurde RH-Wildtyp-Protein gereinigt. Mit dieser Methode lassen sich Aussagen über die unmittelbaren Liganden von Nickel treffen. Die Identifizierung der diatomaren CN^- - und CO-Liganden am Fe erfolgte mit Hilfe der FTIR-Spektroskopie, während mittels EPR-Spektroskopie verschiedene Ni-Zustände beschrieben wurden. Um die RH vertiefenden Analysetechniken, insbesondere der XAS, der FTIR- und der EPR-Spektroskopie zugänglich zu machen, wurden Verfahren der RH-Isolierung optimiert, mit dem Ziel, größere Proteinmengen zu gewinnen.

An den hoch gereinigten Präparaten wurde die Suche nach einem zusätzlichen organischen Kofaktor in der RH fortgesetzt, um letztlich ein redox-sensitives signalleitendes Element zwischen RH und HoxJ zu identifizieren.

2 Material und Methoden

2.1 Organismen und Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind der Tabelle 1 zu entnehmen. Vektoren und Plasmide sind in der Tabelle 2 aufgeführt.

Tab. 1: Bakterienstämme

Stamm	Relevante Eigenschaften	Referenz/Herkunft
<i>Ralstonia eutropha</i>		
H16	Wildtyp, SH ⁺ , MBH ⁺ , RH ⁺ , HoxJ ⁻ (<i>hoxJg1264a</i>)	DSM428, ATCC17699
HF359	Δ <i>hoxG</i> , HoxJ ⁻	Bernhard <i>et al.</i> 1996
HF371	Δ <i>hoxH</i> , Δ <i>hoxG</i> , HoxJ ⁻	Massanz <i>et al.</i> 1997
HF433	SH ⁺ , MBH ⁺ , RH ⁺ , HoxJ ⁺	Lenz 1998
HF435	Δ <i>hoxC</i>	Lenz 1998
HF570	Δ <i>hoxH</i> , Δ <i>hoxG</i> , Δ <i>hoxB</i> , Δ <i>hoxC</i> , Δ <i>nor(R2A2B2)::\Phi(hoxK'-lacZ)</i>	Winter <i>et al.</i> 2004
HF574	Δ <i>hoxH</i> , Δ <i>hoxG</i> , Δ <i>hoxB</i> , Δ <i>hoxC</i> , HoxJ ⁻	Buhrke 2002
HF657	RH (HoxC D15H)	diese Arbeit
<i>Escherichia coli</i>		
JM109	F' <i>traD36 lac^q</i> , Δ (<i>lacZ</i>) <i>M15 pro A⁺B⁺/e14⁻</i> (<i>McrA⁻</i>), Δ (<i>lac-proAB</i>) <i>thi gyrA96 (Nal^r) endA1 hsdR17(r_k⁻ m_k⁺) relA1 supE44 recA1</i>	Yanisch-Perron <i>et al.</i> 1985
S17-1	Tra ⁺ <i>recA pro thi hsdR</i> , <i>chr:RP4-2</i>	Simon <i>et al.</i> 1983

Tab. 2: Vektoren und Plasmide

Vektor/Plasmid	Relevante Eigenschaften	Referenz/Herkunft
Litmus28/29	Amp ^r , ColE1 <i>ori</i>	New England Biolabs
pBlueskript SK+/KS+/SK-	Amp ^r , <i>lacZ'</i> , T7 Φ 10 Promotor, f1 <i>ori</i>	Stratagene Cloning Systems
pACYC177	Amp ^r , Kan ^r , p15A <i>ori</i>	New England Biolabs
pLO2	Kan ^r , <i>sacB</i> , RP4 <i>oriT</i> , ColE1 <i>ori</i>	Lenz <i>et al.</i> 1994
pEDY309	Tet ^r , ' <i>lacZ</i> ', RP4/RK2 <i>ori</i> , Mob ⁺	Kleihues <i>et al.</i> 2000
pCH591	260-bp <i>NdeI-HindIII</i> Fragment (enthält den SH Promotor, PCR-Produkt) in Litmus 29	Kleihues <i>et al.</i> 2000
pCH594	2.5-kb <i>NdeI</i> Fragment (enthält <i>hoxB-hoxC</i>) in pCH591	Kleihues <i>et al.</i> 2000
pCH861	pCH594 <i>Bam</i> HI- <i>Bgl</i> II verdaut und religiert	Buhrke 2002

Vektor/Plasmid	Relevante Eigenschaften	Referenz/Herkunft
pCH971	0.64-kb <i>NcoI</i> - <i>BglII</i> PCR-Produkt (enthält HoxJ ^{Input} -His ₆) in pQE60	Buhrke <i>et al.</i> 2004
pCH978	0.9-kb <i>RsaI</i> - <i>SaII</i> PCR-Produkt (enthält HoxC R411K) in pBlueskript SK(+)	diese Arbeit
pCH980	0.9-kb <i>RsaI</i> - <i>SaII</i> PCR-Produkt (enthält HoxC R411L) in pBlueskript SK(+)	diese Arbeit
pCH981	0.9-kb <i>SpeI</i> - <i>SaII</i> Fragment aus pCH980 (enthält HoxC R411L) in pCH594	diese Arbeit
pCH982	0.9-kb <i>SpeI</i> - <i>SaII</i> Fragment aus pCH978 (enthält HoxC R411K) in pCH861	diese Arbeit
pCH984	5.6-kb inverses PCR-Produkt von pCH594, PNK behandelt, religiert (enthält HoxB- <i>Strep</i> -tag HoxC)	diese Arbeit
pCH985	0.4-kb <i>SacII</i> Fragment aus pCH984 (enthält 'HoxB- <i>Strep</i> -tag) in pCH594	diese Arbeit
pCH986	0.4-kb <i>SacII</i> Fragment aus pCH984 (enthält 'HoxB- <i>Strep</i> -tag und HoxC R411L) in pCH981	diese Arbeit
pCH987	0.4-kb <i>SacII</i> Fragment aus pCH984 (enthält 'HoxB- <i>Strep</i> -tag und HoxC R411K) in pCH982	diese Arbeit
pCH989	0.36-kb <i>SacII</i> PCR-Produkt (HoxC D15H) in pBlueskript SK(+)	diese Arbeit
pCH990	0.36-kb <i>SacII</i> Fragment aus pCH989 (HoxC D15H) in pCH861	diese Arbeit
pCH991	0.36-kb <i>SacII</i> PCR-Produkt (HoxC V12A) in pBlueskript SK(+)	diese Arbeit
pCH992	0.36-kb <i>SacII</i> PCR-Produkt (HoxC V12I) in pBlueskript SK(+)	diese Arbeit
pCH993	0.36-kb <i>SacII</i> PCR-Produkt (HoxC E13Q) in pBlueskript SK(+)	diese Arbeit
pCH1029	0.36-kb <i>SacII</i> PCR-Produkt (HoxC D15L) in pBlueskript SK(+)	diese Arbeit
pCH1030	0.36-kb <i>SacII</i> Fragment aus pCH991 (HoxC V12A) in pCH861	diese Arbeit
pCH1031	0.14-kb <i>FseI</i> - <i>HpaI</i> PCR-Produkt und 0.18-kb <i>RsrII</i> - <i>EcoRV</i> PCR-Produkt (enthält HoxB Δ Q155-L162) in pCH594	diese Arbeit
pCH1032	0.36-kb <i>SacII</i> PCR-Produkt (HoxC E13L) in pBlueskript SK(+)	diese Arbeit
pCH1033	0.55-kb <i>EcoRI</i> - <i>PstI</i> Fragment aus pCH1031 (enthält HoxB Δ Q155-L162) in pBlueskript SK(+)	diese Arbeit
pCH1034	0.36-kb <i>SacII</i> Fragment aus pCH992 (HoxC V12I) in pCH861	diese Arbeit
pCH1035	0.36-kb <i>SacII</i> Fragment aus pCH993 (HoxC E13Q) in pCH861	diese Arbeit

Vektor/Plasmid	Relevante Eigenschaften	Referenz/Herkunft
pCH1036	0.36-kb <i>SacII</i> Fragment aus pCH1032 (HoxC E13L) in pCH861	diese Arbeit
pCH1037	0.36-kb <i>SacII</i> Fragment aus pCH1029 (HoxC D15L) in pCH861	diese Arbeit
pCH1038	0.13-kb <i>FseI</i> - <i>NruI</i> PCR-Produkt und 0.18-kb <i>RsrII</i> - <i>EcoRV</i> PCR-Produkt (enthält HoxB ΔQ155-S166) in pCH594	diese Arbeit
pCH1039	0.55-kb <i>EcoRI</i> - <i>PstI</i> Fragment aus pCH1038 (enthält HoxB ΔQ155-S166) in pBlueskript SK(+)	diese Arbeit
pCH1040	0.64-kb <i>SpeI</i> - <i>EcoRV</i> PCR-Produkt (enthält einen Teil von HoxC) in pBlueskript SK(+)	diese Arbeit
pCH1041	0.37-kb <i>Apal</i> - <i>HpyCH4V</i> PCR-Produkt (enthält einen Teil von HoxC) in pCH1040	diese Arbeit
pCH1042	1.0-kb <i>Apal</i> - <i>PmlI</i> Fragment aus pCH1041 (enthält HoxC ΔQ244-A268) in pCH861	diese Arbeit
pCH1043	0.4-kb <i>NaeI</i> aus pCH990 (enthält HoxC D15H) in pLO2	diese Arbeit
pGE15	15-kb <i>HindIII</i> Fragment (enthält <i>hoxF-hypF2</i> von <i>R. eutropha</i>) aus pHG1 in pVK101	Tran-Betcke <i>et al.</i> 1990
pGE377	2.8-kb <i>HindIII</i> - <i>XbaI</i> Fragment aus pCH594 (enthält P _{SH} - <i>hoxB-hoxC</i>) in pEDY309	Kleihues <i>et al.</i> 2000
pGE378	2.2-kb <i>PvuII</i> - <i>Ecl136II</i> Fragment (enthält P _{lacZ} - <i>hoxA</i>) in pGE377	Kleihues <i>et al.</i> 2000
pGE460	2.9-kb <i>SpeI</i> - <i>HindIII</i> aus pCH862 (enthält HoxB P293 Stopp) in pEDY309	Buhrke <i>et al.</i> 2004
pGE511	3.2-kb <i>SpeI</i> - <i>HindIII</i> aus pCH981 (enthält HoxC R411L) in pEDY309	diese Arbeit
pGE512	3.2-kb <i>SpeI</i> - <i>HindIII</i> aus pCH982 (enthält HoxC R411K) in pEDY309	diese Arbeit
pGE513	2.8-kb <i>SpeI</i> - <i>HindIII</i> aus pCH985 (enthält HoxB- <i>Strep</i> -tag) in pEDY309	diese Arbeit
pGE515	2.8-kb <i>SpeI</i> - <i>HindIII</i> aus pCH987 (enthält HoxB- <i>Strep</i> -tag und HoxC R411K) in pEDY309	diese Arbeit
pGE516	2.8-kb <i>SpeI</i> - <i>HindIII</i> aus pCH986 (enthält HoxB- <i>Strep</i> -tag und HoxC R411L) in pEDY309	diese Arbeit
pGE538	2.8-kb <i>SpeI</i> - <i>HindIII</i> aus pCH990 (enthält HoxC D15H) in pEDY309	diese Arbeit
pGE539	2.8-kb <i>SpeI</i> - <i>HindIII</i> aus pCH1035 (enthält HoxC E13Q) in pEDY309	diese Arbeit

Vektor/Plasmid	Relevante Eigenschaften	Referenz/Herkunft
pGE540	2.8-kb <i>SpeI-HindIII</i> aus pCH1034 (enthält HoxC V12I) in pEDY309	diese Arbeit
pGE541	2.8-kb <i>SpeI-HindIII</i> aus pCH1030 (enthält HoxC V12A) in pEDY309	diese Arbeit
pGE542	2.8-kb <i>SpeI-HindIII</i> aus pCH1036 (enthält HoxC E13L) in pEDY309	diese Arbeit
pGE543	2.8-kb <i>SpeI-HindIII</i> aus pCH1037 (enthält HoxC D15L) in pEDY309	diese Arbeit
pGE544	2.8-kb <i>SpeI-HindIII</i> aus pCH1031 (enthält HoxB Δ Q155-L162) in pEDY309	diese Arbeit
pGE545	2.8-kb <i>SpeI-HindIII</i> aus pCH1038 (enthält HoxB Δ Q155-S166) in pEDY309	diese Arbeit
pGE546	2.8-kb <i>SpeI-HindIII</i> aus pCH1042 (enthält HoxC Δ Q244-A268) in pEDY309	diese Arbeit
pGE547	2.8-kb <i>SpeI-HindIII</i> aus pCH(#1575 OL/JH) (enthält HoxC D15H) in pEDY309	diese Arbeit
pGE567	(<i>hoxB</i> _{Stopp} - <i>Strep</i> -tag- <i>hoxC</i>)	Buhrke <i>et al.</i> 2005b

2.2 Nährmedien

Die Medien und die dafür notwendigen Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, in bidestilliertem Wasser (ddH₂O) angesetzt. Nicht durch Autoklavieren sterilisierte Lösungen wurden sterilfiltriert. Feste Nährmedien enthielten 1.2 % [w/v] Agar (Becton Dickinson).

2.2.1 Medien für die Anzucht von *Ralstonia eutropha*

Für die Anzucht von *R. eutropha*-Stämmen wurde ein modifiziertes Mineralmedium (MM) verwendet (Friedrich *et al.* 1982). Der Zusatz von Nickelchlorid erfolgte, wie an entsprechender Stelle vermerkt, in unterschiedlichen Konzentrationen. Die Zusammensetzung der MM ist der nachfolgenden Tabelle 3 zu entnehmen.

Tab. 3: Zusammensetzung des Mineralmediums

Substanz	Volumen [ml]	Konzentration der Stammlösung
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1	20 %
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	1	1 %
NH ₄ Cl	10	20 %
H16-Puffer ^(a) , pH 7.0	100	10fach
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	0.8	1 mM
FeCl ₃ x 6 H ₂ O	1	0.5 % in 0.1 N HCl
ddH ₂ O	ad 1000	

^(a) H16-Puffer besteht aus 90 g Na₂HPO₄ x 12 H₂O, 15 g KH₂PO₄, ad 1 l ddH₂O

Bei heterotrophen Anzuchten wurden entweder Fruktose (0.4 % [w/v]) oder Fruktose und Glycerin (je 0.2 % [w/v]) als Kohlenstoffquellen zugesetzt. Chemolithoautotroph wachsende Kulturen wurden, wenn nicht anders angegeben, in MM unter einer Gasatmosphäre von 80 % H₂, 10 % CO₂ und 10 % O₂ angezogen. Das Medium enthielt in diesem Fall keine weitere C-Quelle.

2.2.2 Medien für die Anzucht von *Escherichia coli*

Die verwendeten *E. coli*-Stämme wurden in LB-Medium angezogen, dessen Zusammensetzung in der Tabelle 4 aufgeführt ist.

Tab. 4: Zusammensetzung des LB-Mediums

Substanz	Volumen bzw. Masse
Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
ddH ₂ O	ad 1000 ml

R. eutropha wurde in LSLB-Medium angezogen. Es enthielt, wie das LB-Medium, 10 g Trypton und 5 g Hefeextrakt, aber nur 2.5 g NaCl auf 1000 ml ddH₂O. Feste Komplexmedien enthielten zusätzlich 1.2 % [w/v] Agar.

2.2.3 Antibiotika und andere Medienzusätze

Alle verwendeten Antibiotika sind in der Tabelle 5 zusammengestellt.

Tab. 5: Stammlösungen verwendeter Antibiotika

Antibiotikum	Stammlösung [mg/ml]	Organismus	Endkonzentration [$\mu\text{g/ml}$]	
			Feste Medien	Flüssigmedien
Ampicillin (Amp)	100	<i>E. coli</i>	100	50
Kanamycin (Kan)	25	<i>E. coli</i>	25	25
	100	<i>R. eutropha</i>	350	-
Tetracyclin (Tet)	20	<i>E. coli</i>	20	10
	20	<i>R. eutropha</i>	10	6

Andere Medienzusätze waren Isopropyl- β -Thiogalaktopyranosid (IPTG, 1 M) in einer Endkonzentration von 1 mM und 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -Galaktopyranosid (X-Gal, 20 mg/ml) in einer Endkonzentration von 40 $\mu\text{g/ml}$. Lösungsmittel für IPTG war ddH₂O. X-Gal wurde in N,N'-Dimethylformamid (DMF) gelöst.

2.3 Zellanzucht und Ernte

Heterotrophe Anzuchten kleiner Mengen wurden in 100 ml Flüssigmedium im Erlenmeyerkolben durchgeführt. Das Verhältnis von Medium- zu Kulturvolumen lag bei 1:10. Die Kulturen wurden auf einem Rotationsschüttler inkubiert. *E. coli*-Kulturen wuchsen bei 37 °C und 180 U/min, *R. eutropha*-Stämme bei 30 °C und 120 U/min. Flüssigkulturen unter lithoautotrophen Bedingungen wurden in Witt'schen Töpfen auf dem Rotationsschüttler bei 120 U/min und 30 °C inkubiert, in einer Gasatmosphäre, bestehend aus H₂, O₂ und CO₂, in einem Volumenverhältnis von 8:1:1. Die Anzucht größerer Kulturen fand im 10-l-Fermenter bzw. 50-l-Fermenter statt. Im 10-l-Fermenter wurden 10 l FGN-Medium mit 200 ml Inokulum, im 50-l-Fermenter 50 l FGN-Medium mit 1 l Inokulum versetzt. Die als Inokulum dienende Vorkultur wurde 2 %ig angeimpft. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C. Die Rührgeschwindigkeit betrug 400 U/min. Während der 48-stündigen Anzucht wurde die Kultur kontinuierlich mit Druckluft (4 l/min) durchgast. Die Agarplatten wurden entweder unter Luft bei 30 °C bzw. 37 °C oder unter der oben angegebenen Gasatmosphäre bebrütet.

Für die Messung der Hydrogenase-Aktivitäten wurden die Zellen aus FGN-Kulturen bei einer optischen Dichte (OD_{436nm}) von ca. 10 geerntet. Die Ernte von Zellen mit einem Kulturvolumen bis zu 100 ml erfolgte in einer Tischzentrifuge (Heraeus Megafuge 1.0R) bei 4500 U/min, 4 °C und 15 min. Für Volumen über 100 ml wurde eine Kühlzentrifuge (Sorvall RC 5C) bei 10000 x g, 10 min und 4 °C verwendet. Anschließend wurden die Zellen, wenn nicht anders angegeben, in Tris-HCl-Puffer bei pH 8.0 gewaschen und

wiederum volumenabhängig, wie oben beschrieben abzentrifugiert. Zellkulturen bis zu 2 ml wurden bei 13000 U/min (Heraeus Biofuge 13) oder 15000 U/min (Sigma 2K15 Kühlzentrifuge) geerntet. Die Fermenterkulturen wurden mit Hilfe einer Durchlaufzentrifuge (Contifuge 17 RS, Heraeus) bei 12000 U/min und 4 °C geerntet.

2.4 Bestimmung von Wachstumsparametern

Das Wachstum von *R. eutropha*-Kulturen wurde durch Trübungsmessungen im Photometer (Spektrophotometer, Hitachi) bei einer Wellenlänge von 436 nm gegen FGN-Medium bestimmt. Das Wachstum von *E. coli*-Kulturen wurde bei einer Wellenlänge von 600 nm gegen LB-Medium gemessen. Die Proben wurden durch Verdünnungen so eingestellt, dass die am Photometer abgelesene optische Dichte (OD) unterhalb von 0.4 lag.

2.5 Konservierung von Bakterienstämmen

Bakterienstämme auf Agarplatten wurden maximal 4 Wochen bei 4 °C gelagert. Bakterienstämme in LB- bzw. FN-Flüssigkulturen wurden durch den Zusatz steriler Glycerinlösung (17.5 % Endkonzentration) in der späten exponentiellen Wachstumsphase konserviert. Diese so genannte Glycerinkultur wurde bei -80 °C gelagert. Zellmaterial konnte mit Hilfe einer sterilen Pipette von der gefrorenen Kultur abgekratzt werden.

2.6 Zellaufschluss und Herstellung von Extrakten

Nach der Ernte wurden die Zellen, wenn nicht anders angegeben, in 2.5 ml Tris-HCl-Puffer (50 mM, pH 8.0) resuspendiert und durch dreimalige Passage durch die French-Press (Amicon) bei 900 Psi aufgeschlossen. Ganze Zellen und Zelltrümmer wurden in einem anschließenden Zentrifugationsschritt in einer Ultrazentrifuge (Sorvall OTD 65B mit dem Festwinkelrotor T-1270) bei 36000 U/min, 30 min und 4 °C abgetrennt. Beim Aufschluss größerer Zellmassen (bis ca. 35 g) wurde das gewaschene Pellet in etwa der gleichen Masse Tris-HCl-Puffer (50 mM, pH 8.0) resuspendiert. Anschließend erfolgte die dreimalige Passage durch die French-Press (Amicon) bei 11000 Psi. Zelltrümmer und ganze Zellen wurden mit Hilfe einer Ultrazentrifuge (Sorvall OTD 65B, mit den Festwinkelrotoren T-865 bzw. T 673.5) bei 36000 U/min, 30 min und 4 °C

entfernt. Der entstandene lösliche Extrakt wurde durch Dekantieren vom Pellet getrennt. Die spezifische Aktivität ist stark abhängig von den Zellaufschlussbedingungen.

2.7 Reinigung der RH

Die RH wurde aus den *R. eutropha*-Derivaten HF371(pGE378) und HF574(pGE378) isoliert, die eine Überexpression der RH ermöglichen (Kleihues *et al.* 2000). Die Stämme wurden in FGN-Medium kultiviert. Die geernteten Zellen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20 °C gelagert. Für die RH-Reinigung wurden 90 g der Zellen in 35 ml 50 mM KPO₄-Puffer (pH 7.0) unter Zusatz von 0.1 mM Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF) und 100 U DNase (DNaseI, RNase-free; Roche) resuspendiert und mit Hilfe einer French Press (SLM Aminco) aufgeschlossen (siehe Kapitel 2.3). Zelltrümmer und Membranen wurden durch Ultrazentrifugation abgetrennt. Der Überstand bildete den löslichen Extrakt, der zunächst in einen Zentrifugenbecher überführt und mit Hilfe eines Magnetrührers in einem Eisbad langsam gerührt wurde. Durch mehrmaliges Evakuieren und Begasen mit H₂ wurde die Atmosphäre in dem Probengefäß geändert. Nach 30 minütiger Inkubation bei 4 °C erfolgte eine Hitzefällung durch Schwenken des Bechers in einem auf 65 °C temperierten Wasserbad für 10 min. Nach dem Abkühlen der Probe für 10 min bei 4 °C wurde der Becher geöffnet. Alle anschließenden Arbeitsschritte erfolgten an der Luft. Die durch die Hitzefällung denaturierten Proteine wurden in einem Zentrifugationsschritt (10 min, 16000 x g, 4 °C) abgetrennt. Der Überstand wurde mit einer gesättigten Ammoniumsulfatlösung bis zu einer Sättigung von 25 % versetzt. Die ausgefallenen Proteine wurde durch erneutes Zentrifugieren (20 min, 16 000 x g, 4 °C) abgetrennt. Der entstandene klare Überstand wurde direkt für die hydrophobe Interaktionschromatographie verwendet. Die Auftrennung der Probe erfolgte mit Hilfe einer 7.85 ml-POROS 20 ET-Säule (Ethylgruppe) bei Raumtemperatur mit einer Flussrate von 40 ml/min an einer BioCAD Sprint Workstation (Applied Biosystems). Nach dem Äquilibrieren der Säule mit 3 Säulenvolumen (CV) Puffer B (1 M (NH₄)₂SO₄ in 50 mM KPO₄-Puffer, pH 7.0) wurden 4.5 ml der Probe über eine 5 ml-Probenschleife aufgetragen. Die Säule wurde mit 5 CV Puffer B gewaschen. Es folgte eine Stufe auf 25 % Puffer A (50 mM KPO₄-Puffer, pH 7.0) und 75 % Puffer B für 14 CV. Nach 2 CV wurde begonnen 4 ml-Fractionen zu sammeln. Die RH eluierte mit der nächsten Stufe auf 60 % Puffer A und 40 % Puffer B. Diese Stufe wurde für 5 CV gehalten. Im Anschluss folgte eine Stufe von 100 % Puffer A für 5 CV zum Waschen der Säule. In wiederholten Säulenläufen dieser Art wurde der

gesamte Proteinextrakt gereinigt. Die Fraktionen wurde auf ihre H₂-oxidierende Aktivität geprüft und die RH-haltigen Fraktionen vereinigt. Die Proteine in dieser Sammelfraktion wurden durch Zugabe von Ammoniumsulfat bis zu einer Sättigung von 60 % ausgefällt und durch Zentrifugation (20 min, 16 000 x g, 4 °C) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und die Proteinpellets in 5-10 ml Puffer A resuspendiert. Diese Suspension wurde in Dialyseschläuche (Visking dialysis tubing; Serva) überführt und für 12 h gegen Puffer A dialysiert. Nach erneuter Zentrifugation (20 min, 16 000 x g, 4 °C) des Dialysats, wurde der klare Überstand einer Anionenaustausch-Chromatographie unterzogen. Unter Verwendung der BioCAD Sprint Workstation wurden die Proteine über eine 1.7 ml POROS 20 HQ-Säule (quarentäres Ammonium) bei Raumtemperatur mit einer Flussrate von 5 ml/min aufgetrennt. Die Säule wurde mit 5 CV Puffer A äquilibriert, und 1 ml der Probe wurde über die 2 ml-Probenschleife aufgetragen. Zeitgleich begann das Sammeln von 1 ml-Fraktionen. Die Säule wurde mit 6 CV Puffer A gewaschen. Die RH bindet unter diesen Bedingungen nicht an die Säule und konnte somit im Durchlauf separiert werden. Die Säule wurde mit 8 CV 100 % Puffer C (2 M KCl in 50 mM KPO₄, pH 7.0) für 8 CV regeneriert. Anschließend erfolgte das erneute Äquilibrieren der Säule mit 10 CV Puffer A. Die Fraktionen, die H₂-oxidierende Aktivität aufwiesen, wurden vereinigt und durch Ultrafiltration (Centriprep YM-10; Amicon Ultra-15; Millipore) auf ein Volumen von unter 1 ml eingeeengt. Sollte die Probe für spektroskopische Untersuchungen weiter verwendet werden, dann war eine erneute Dialyse gegen 10 mM Tris-HCl-Puffer bei pH 8.0 notwendig. Zur Lagerung wurde die gereinigte RH in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

2.8 Reinigung von HoxB_{Strep-tag}-HoxC

Zur Proteinreinigung mittels *Strep-tag* wurde das Protokoll nach Skerra und Schmidt (1999) eingesetzt. Die Zellen von *R. eutropha* HF574(pGE513) und HF574(pGE567) wurden im Verhältnis 1:1 [w/v] mit *Strep-tag*-Puffer A (100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 8.0) versetzt und resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte an der French Press (SLM Aminco). Durch anschließende Ultrazentrifugation wurden Zelltrümmer und Membranen sedimentiert. Der klare Überstand bildete den löslichen Extrakt, der sofort einer Affinitätschromatographie unterzogen wurde. Der lösliche Extrakt wurde auf eine mit Streptactin Superflow (IBA) gefüllte Glassäule (Applied Biosystems) aufgetragen und mit Hilfe der BioCAD Sprint Workstation (Applied Biosystems) gereinigt. Die Säule mit einem Säulenvolumen von 4.5 ml wurde zunächst mit 3 CV *Strep-tag*-Puffer A und einer Flussrate von 250 cm/h äquilibriert. Das Auftragen von 5 ml der Probe erfolgte mit

einer Flussrate von 100 cm/h über 5 CV. Dieser Vorgang wurde bis zu dreimal wiederholt, so dass die Säule mit maximal 15 ml löslichen Extrakt beladen war. Dem Auftragen schloss sich ein Waschschrift über 20 CV an mit einer Flussrate von 250 cm/h. Dabei konnte der größte Teil der unspezifisch an die Säule gebundenen Proteine entfernt werden. Das getaggte Protein wurde anschließend mit 6 CV *Strep*-tag-Puffer B (100 mM Tris-HCl, 450 mM NaCl, 5 mM Desthiobiotin, pH 8.0) bei 100 cm/h eluiert. Das Säulenmaterial wurde über 10 CV bei 250 cm/h mit *Strep*-tag-Puffer C (100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM HABA (2-[4'-Hydroxyphenylazo]benzoesäure, pH 8.0) regeneriert und anschließend über 40 CV bei 250 cm/h mit *Strep*-tag-Puffer A gewaschen. Die Eluate wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und die Fraktionen des gewünschten Bereichs zusammengefasst und durch Dialyse umgepuffert in 20 mM Tris-HCl, pH 8.0. Durch Ultrafiltration (Centriprep 50, Amicon Ultra-15; Millipore bzw. Microcon 10; Amicon) war es möglich, die Sammelfraktionen auf ein Volumen von weniger als 1 ml einzuengen. Die Proteine wurden für die längere Lagerung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

2.9 Reinigung von 6xHis-HoxJ^{Input}-RH

400 ml LB-Medium wurden mit einer frischen Übernacht-Kultur von *E. coli* JM109(pCH971) angeimpft und bis zu einer OD_{600nm} von 0.8 kultiviert. Die Expression von 6xHis-HoxJ^{Input} wurde durch die Gabe von IPTG zu einer Endkonzentration von 1 mM induziert. Nach 4 Stunden Wachstum wurden die Zellen geerntet, in 3 ml His-tag-Puffer (50 mM NaPO₄, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8.0) resuspendiert und mit Hilfe der French Press (SLM Aminco) aufgeschlossen. Die Zelltrümmer und Membranen wurden durch anschließende Ultrazentrifugation abgetrennt. Der klare Überstand bildete den löslichen *E. coli*-Extrakt.

Weiterhin wurden 20-30 g Zellen von RH-überexprimierenden *R. eutropha*-Stämmen im Verhältnis 1:1 [w/v] mit His-tag-Puffer versetzt und resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte an der French Press (SLM Aminco). Durch anschließende Ultrazentrifugation wurden Zelltrümmer und Membranen sedimentiert. Der klare Überstand bildete den löslichen *R. eutropha*-Extrakt. Eine mit Ni-NTA Superflow (Qiagen) gefüllte Glassäule (Applied Biosystems) und die BioCAD Sprint Workstation (Applied Biosystems) wurde für die Anreicherung des 6xHis-HoxJ^{Input}-RH-Komplexes verwendet. Die Säule mit einem Säulenvolumen von 6.8 ml wurde zunächst mit 5 CV Puffergemisch aus 95 % His-tag-Puffer A (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, pH 8.0) und 5 % His-tag-Puffer B (50 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 400 mM Imidazol, pH 8.0) bei einer Flussrate von 2 ml/

min äquiliibriert. Auf die vorbereitete Säule wurden mit einer Flussrate von 1 ml/min 2 ml löslicher Extrakt von *E. coli* JM109(pCH971) aufgetragen, der das 6xHis-HoxJ^{Input}-Fragment enthielt. Um die nicht bindenden Proteine von der Säulenmatrix zu entfernen, wurde diese über 20 CV mit einer Flussrate von 2 ml/min gespült. Anschließend wurden auf diese Säule 5 ml RH-haltiger *R. eutropha*-Extrakt mit einer Flussrate von 1 ml/min aufgetragen. Dieser Schritt wurde bis zu viermal wiederholt, so dass die Säule mit maximal 20 ml löslicher Extrakt von *R. eutropha* beladen war. Diesem Auftragen schloss sich ein erneuter Waschschrift über 20 CV an mit einer Flussrate von 2 ml/min. Alle Proteine, die nicht direkt mit Ni-NTA oder der Input-Domäne von HoxJ interagierten, wurden so von der Säule entfernt. Der getaggte Proteinkomplex wurde schließlich mit einem Puffergemisch aus 37.5 % His-tag-Puffer A und 62.5 % His-tag-Puffer B (250 mM Imidazol Endkonzentration) über 5 CV eluiert. In einer weiteren Stufe wurde die Säule mit 400 mM Imidazol (100 % His-tag-Puffer B) über 5 CV gewaschen, um das Eluieren aller noch gebundenen Proteine zu gewährleisten. Anschließend wurde die Säule für 20 CV bei einer Flussrate von 2.5 ml/min mit His-tag-Puffer A gespült, um alles Imidazol vom Säulenmaterial zu entfernen. Die Eluate wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und die RH-HoxJ^{INPUT}-haltigen Fraktionen vereinigt. Eine anschließende zweistündige Dialyse ermöglichte das Umpuffern in 20 mM Tris-HCl bei pH 8.0. Durch Ultrafiltration (Centriprep 50, Amicon Ultra-15; Millipore) wurden die Proben soweit wie möglich eingengt. Die Proteine wurde für die längere Lagerung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

2.10 Enzymaktivitätsbestimmungen

2.10.1 H₂-Oxidierende Aktivität der RH

Zur Bestimmung der H₂-oxidierenden Aktivität der RH wurde ein amperometrischer Enzymtest mit Hilfe einer modifizierten Sauerstoff-Elektrode des Clark-Typs (Digital Oxygen Electrode, Modell 10; Rank Brothers, Cambridge) durchgeführt. Durch die Umkehr der Polarität war die direkte amperometrische Messung von H₂ möglich (Sweet *et al.* 1980). Die Clark-Elektrode bestand aus einem Pt/AgCl/Ag-System und wurde durch das Anlegen einer Spannung von 0.6 V polarisiert. In der Versuchsanordnung stand die Elektrode durch eine seitliche Öffnung in der Probenkammer (2.7 ml Volumen) mit dem Reaktionsgemisch in Kontakt. Für die Aktivitätsbestimmungen ließ sich die Probenkammer auf 30 °C temperieren und der Kammerinhalt wurde mittels eines Magnetrührers ständig gemischt. Nach Einfüllen von 2.58 ml Puffer (50 mM

KPO₄, pH 7.0; mit N₂ anaerobisiert) und Zugabe von 20 µl Methylenblau-Lösung (50 mM in 50 mM KPO₄, pH 7.0) als artifiziellen Elektronenakzeptor wurde ein Schornstein auf die Probenkammer gesetzt, um das Entweichen von H₂ zu minimieren. Anschließend erfolge die Gabe von 100-200 µl H₂-gesättigtem ddH₂O mit Hilfe einer gasdichten Hamiltonspritze durch die Kapillarbohrung des Schornsteins. Die Reaktion wurde durch das Injizieren von 5-250 µl der Proteinprobe gestartet. Die Abnahme von H₂ wurde mit dem Schreiber (LKB Rec 101, Amersham Pharmacia, 3 cm/min Papiervorschub) aufgezeichnet. Als interner Standard diene der Schreiberausschlag nach Zugabe des H₂-gesättigten ddH₂O, unter Berücksichtigung der Löslichkeit von H₂ in H₂O bei Raumtemperatur von 0.78 µmol/l. Ein Unit ist definiert als die Oxidation von 1 µmol H₂ pro min. Die spezifische Aktivität wurde mit der folgenden Gleichung berechnet:

$$RH_{\text{spez}} [\text{U/mg}] = [\Delta H_2(1) - \Delta H_2(2)] \times c(\text{H}_2\text{O}/\text{H}_2) \times V(\text{H}_2\text{O}/\text{H}_2) \times v_s / (\Delta_s \times V_p \times c_p)$$

$\Delta H_2(1)$ - Änderung der H₂-Konzentration nach Zugabe der Proteinprobe [Skalenteile/cm]

$\Delta H_2(2)$ - Abnahme der H₂-Konzentration vor Zugabe der Proteinprobe [Skalenteile/cm]

$c(\text{H}_2\text{O}/\text{H}_2)$ - Löslichkeit von H₂ in ddH₂O bei 1.0133 bar und 20 °C ist konstant 0.78 µM

$V(\text{H}_2\text{O}/\text{H}_2)$ - eingesetztes Volumen an H₂-gesättigtem ddH₂O [ml]

v_s - Schreibervorschub [cm/min]

Δ_s - Schreiberausschlag nach Zugabe des gesättigten ddH₂O [Skalenteile]

V_p - eingesetztes Probenvolumen [ml]

c_p - Proteinkonzentration der eingesetzten Probe [mg/ml]

2.10.2 D₂-/H⁺-Austausch der RH

D₂-/H⁺-Austauschreaktionen wurden anaerob in einer 10-ml-Kammer (Durchmesser 15 °Cmm) durchgeführt. Der Aufbau der Messkammer ist in der Referenz (Jouanneau *et al.* 1980) genauer beschrieben. Die Kammer war über eine mit einer Teflonmembran abgedichtete Bohrung am Boden der Kammer, sowie eine Vakuumleitung mit einem Massenspektrometer (Masstorr DX 200, VG Quadrupoles Ltd.) verbunden. Die Reaktion wurde bei 30 °C in MES-Puffer (50 mM, pH 5.5) gesättigt mit 20 % D₂ in Ar durchgeführt. Durch Gabe von löslichem Extrakt wurde die Reaktion gestartet und kontinuierlich die Bildung der Produkte HD und H₂ massenspektrometrisch verfolgt. Nach dem Bunsenschen Löslichkeitskoeffizienten α sind bei 30 °C und einem Partialdruck von 10⁵ Pa in Wasser folgende Konzentrationen gelöst (Muccitelli & Wen 1978): D₂=0.775 mM; H₂=0.726 mM; für HD wurden 0.75 mM angenommen. Ein Unit entspricht der Aktivität, die 1 µmol HD bzw. H₂ pro min bildet.

2.10.3 *Para*-H₂-/*ortho*-H₂-Konversion der RH

Nach Hartmann et al. (1996) wurde molekularer Wasserstoff zusammengesetzt aus 55 % *para*-H₂ und 45 % *ortho*-H₂ hergestellt. Zu 1 ml Tris-HCl-Puffer (50 mM, pH 8.0, 10 mM Na-Dithionit) wurden unter einer Argon-Atmosphäre 5 ml *para*-angereicherter H₂ gegeben. Die Reaktion wurde durch Zusatz von angereichertem RH-HoxJ^{Input}-Fusionsprotein gestartet und vorsichtig bei 35 °C geschüttelt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden 0.1 ml-Aliquots aus dem Ansatz entnommen und beide Spin-Isomere in einem Gaschromatographen mit Wärmeleitfähigkeitsdetektor untersucht, in welchem sich die beiden Spin-Isomere separieren ließen (Berlier *et al.* 1990).

2.10.4 β -Galaktosidase

Die β -Galaktosidase-Aktivität wurde durch die Quantifizierung von 2-Nitrophenol bestimmt, welches durch die enzymatische Hydrolyse von 2-Nitrophenol- β -D-Galaktopyranosid (o-NPG) entstand. Für den Reaktionsansatz wurden in einem Reagenzglas 960 μ l Z-Puffer (60 mM Na₂HPO₄, 40 mM NaH₂PO₄, 10 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 50 mM β -Mercaptoethanol) vorgelegt. Nach Zugabe von 10 μ l Na-Desoxycholat (Na-DOC)-Lösung (1 % [w/v]) und 20 μ l Zellsuspension wurde der Reaktionsansatz zur Permeabilisierung der Zellen für 15 min bei 30 °C vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch die Gabe von 200 μ l o-NPG-Lösung (0.4 % [w/v] in 50 mM KPO₄-Puffer, pH 7.0) gestartet. Die Reaktion erfolgte je nach enzymatischer Aktivität 2 bis 30 min bei 30 °C und wurde durch das Hinzupipettieren von 500 μ l Na₂CO₃-Lösung abgestoppt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (10 min, 4500 U/min, 25 °C, Megafuge 1.0R, Heraeus) sedimentiert. Das gebildete 2-Nitrophenol wurde durch Absorptionsmessung des Überstands bei 420 nm an einem Spektralphotometer (U-2000, Hitachi) quantifiziert. Die Aktivität der β -Galaktosidase wurde in Anlehnung an das Protokoll von Miller et al. (1972) in Units nach folgender Gleichung berechnet:

$$\beta\text{-Galaktosidaseaktivitt [U]} = 1000 \times A_{420\text{nm}} / (V \times t \times \text{OD}_{436\text{nm}})$$

V - eingesetztes Probenvolumen [ml]

t - Reaktionsdauer [min]

OD_{436nm} - optische Dichte der Probe bei $\lambda = 436 \text{ nm}$

2.11 Proteinbezogene Techniken

2.11.1 Proteinbestimmung

Für die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration in den Proben wurde die Methode nach Lowry et al. (1951) angewendet. Als Standard diente eine Rinderserumalbumin(BSA)-Lösung (5 mg/ml), mit der eine Eichkurve von 0 bis 100 μg Protein im Ansatz erstellt wurde. Der Standard und die Probenanstze wurden gleich behandelt. Jeweils 50 ml einer 3 %igen [w/v] Na_2CO_3 -Lösung (in 0.1 N NaOH), 1 ml einer 2 %igen [w/v] KNa-Tartrat-Lösung und 1 ml einer 1 %igen [w/v] $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{ H}_2\text{O}$ -Lösung bildeten ein Reaktionsgemisch, von dem 2.5 ml zu einer geeigneten Probenmenge pipettiert und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Anschließend wurden 250 μl Folin-Reagenz (Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz 1:2 in ddH₂O verdünnt) unter kräftigem Schütteln dazu pipettiert. Nach 30 min Inkubation wurde die Absorption photometrisch (Spectra Max 340, Molecular Devices) bei einer Wellenlänge von 546 nm gegen den Probenpuffer gemessen.

2.11.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

2.11.2.1 Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen (SDS-PAGE)

In diskontinuierlichen Natriumdodecylsulfat(SDS)-Polyacrylamidgelen wurden die Proteine aufgetrennt (Laemmli 1970). Der Vernetzungsgrad C_{Bis} aller Gele lag bei 2.7 %. Die Konzentration des totalen Monomers T für die Sammelgele lag bei 4 %. Die Trenngele hatten T-Werte zwischen 10 und 15 %. Proteinauftrennungen für die Routine erfolgten in Minigelen (10 x 8 x 0.1 cm) in der Vertikalgelkammer (M1005.1, cti) für 1 h bei 45 mA (Netzgerät ECPS 3000/150; Amersham Pharmacia) pro Gel bei Raumtemperatur. Groere Proteinmengen wurden in Standardgelen (18 x 16 x 0.15 cm) in einer Vertikalgelkammer (LKB 2001, Amersham Pharmacia) bei 8 °C für 10 bis 15 h bei 15 bis 50 mA aufgetrennt. Als Elektrophoresepuffer diente SDS-Laufpuffer (25 mM Tris-HCl, 192 mM Glycin, 0.1 % [w/v] SDS; pH 6.8). Die Proteine wurden mit einem Volumenteil des Probenauftragspuffers (5fach: 500 mM Tris-HCl, 10 % SDS, 0.05 % Bromphenolblau, 40 % Glycerin, 2.5 % β -Mercaptoethanol, pH 6.8) versetzt, in

einem siedenden Wasserbad 3 min denaturiert und anschließend auf das Gel aufgetragen. Die Größenbestimmung der aufgetrennten Proteine erfolgte mittels kommerzieller Standards (Bench Mark Prestained Protein Ladder, Invitrogen; Protein Marker Broad Range, NEB; Prestained Protein Marker Broad Range, NEB).

2.11.2.2 Gelelektrophorese unter nativen Bedingungen (native PAGE)

Gradientengele wurden über einen Gradientenformer (Hoefer, Scientific Instruments) aus zwei Komponenten mit Konzentrationen des totalen Monomers T von 4 bzw. 15 % gegossen. Das darüber geschichtete Sammelgel hatte einen T-Wert von 3.1 %. Der Vernetzungsgrad betrug 2.7 %. Die Proteinproben wurden mit einem Volumen Probenauftragspuffer (180 mM Tris, 160 mM Borsäure, 5 mM EDTA, 20 % Glycerin und 0.05 % Bromphenolblau) versetzt. Die Elektrophorese erfolgte in einer Vertikalelektrophoreseapparatur (LKB 2001, Amersham Pharmacia) für 15 h bei konstant 150 V in TBE-Puffer (90 mM Tris, 80 mM Borsäure, 2.5 mM EDTA).

2.11.2.3 Färbung der Proteine im Polyacrylamidgel mit Coomassie-Blau

Die Proteingele wurden auf einer Schwenkapparatur (Celloshaker, Renner) für 10 bis 15 min gefärbt (1.25 g Coomassie Brilliant Blue G-250, 227 ml Methanol, 46 ml Eisessig, ad 500 ml ddH₂O) und anschließend unter mehrmaligen Lösungswechsel entfärbt (330 ml Methanol, 227 ml Eisessig, ad 1000 ml ddH₂O).

2.11.2.4 Nachweis von RH-Aktivität nach nativer PAGE

Zum quantitativen Nachweis der H₂-oxidierenden Aktivität der RH nach Auftrennung der Proteine in der nativen PAGE wurde das Gel in einer 500 ml Serumflasche mit 250 ml 50 mM KPO₄-Puffer bei pH 7.0 für ca. 30 min mit H₂ begast. Nach Zugabe von Phenazinmethosulfat (PMS) und p-Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) (Endkonzentration 78 µM bzw. 66 µM) wurde die Flasche vor Licht geschützt bei 30 °C inkubiert. Die Bildung von violett gefärbten Banden im Gel zeigte die RH-vermittelte, H₂/PMS-abhängige Reduktion des Farbstoffs NBT an. Die Reaktion wurde bei ausreichender Bandenintensität mit H₂O abgestoppt.

2.11.3 Immunoblot-Analyse

2.11.3.1 Antikörper

Für den immunologischen Nachweis der beiden RH-Untereinheiten HoxB und HoxC und der Histidin-Proteinkinase HoxJ von *R. eutropha* standen polyklonale Antikörper anti-HoxB, anti-HoxC und anti-HoxJ aus Kaninchenserum zur Verfügung (T. Buhrke).

2.11.3.2 Proteintransfer

Die Auftrennung der Proteine erfolgte durch SDS-Gelelektrophorese oder durch native PAGE. Anschließend wurden die Proteine elektrophoretisch (Transphasor Electroblotting Unit 2005, Amersham Pharmacia) auf eine Nitrocellulosemembran (BA85, 0.45 µm, Schleicher und Schuell) übertragen (Towbin *et al.* 1992). Als Transferpuffer diente Tris-Glycin-Puffer (192 mM Glycin, 25 mM Tris). Der Transfer erfolgte bei 8 °C für 30 bis 60 min bei 1 A. Der Erfolg des Transfers wurde im Anschluss durch eine Färbung mit dem reversibel bindenden Farbstoff Ponceau-S kontrolliert, der sich durch mehrmaliges Waschen mit Wasser wieder von der Membran entfernen lässt.

2.11.3.3 Detektion markierter Proteine

Die Nitrocellulosemembran wurde nach dem Proteintransfer in einer Photoschale nacheinander mit den in der Tabelle 6 angegebenen Lösungen versehen. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur unter ständigem Schwenken (Celloshaker, Renner).

Tab. 6: Entwicklung von Immunoblots

Anwendung	Substanz
1 h	Blockpuffer (35 g Magermilchpulver, ad 1 l mit einfach Tris-Saline-Puffer + Tween 20 (TBST-Puffer), pH 7.5)
45 min	1. Antikörper: gerichtet gegen die entsprechenden Proteinuntereinheiten von <i>R. eutropha</i>
3 x 10 min	Spülen der Membran mit Blockpuffer
30-40 min	2. Antikörper: 10 µl Alkalische Phosphatase, gekoppelt an Ziege anti-Kaninchen-IgG-Lösung (Dianova) in 100 ml TBST (einfach)
3 x 10 min	Waschen mit einfach TBST-Puffer (10fach TBST enthält: 2 % [w/v] NaCl, 1 M Tris, pH 7.5, 0.7 % Tween 20, ad 1 l ddH ₂ O)
1 x 10 min	Waschen mit einfach TBS-Puffer (10fach TBS enthält: 2 % [w/v] NaCl, 1 M Tris, pH 7.5, ad 1 l ddH ₂ O)
1 x	Spülen mit ddH ₂ O

Für die anschließende Farbreaktion wurden 50 µl 5-Brom-4-Chlor-Indolyl-Phosphat-p-Toluidinsalz (BCIP)-Lösung (50 mg/ml BCIP in 100 % DMF) und 50 µl NBT-Lösung (100 µg/ml NBT in 70 % DMF) mit 50 ml Entwicklungspuffer (100 mM Tris, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂ x 6H₂O, pH 9.5) gemischt und auf die Membran gegeben. Die Färbung verlief im Dunkeln bei Raumtemperatur und ohne Schwenken. Nach Erreichen der gewünschten Farbintensität wurde die Reaktion mit ddH₂O abgestoppt.

2.12 Spektroskopie

2.12.1 Röntgenabsorptionsspektroskopie (XAS)

Die XAS-Daten an der Ni-Kante wurden wie in Haumann *et al.* (2003) beschrieben aufgenommen und ausgewertet.

2.12.2 Elektronenspinresonanzspektroskopie (EPR)

Die EPR-Spektren wurden an einen Spektrometer (Bruker ESP300E) aufgenommen, das mit einem Kryostaten ausgestattet war (ESR 900 helium flow crystat, Oxford Instruments). Die RH-Proteine wurden mit Hilfe des HoxJ^{INPUT}-His₆-Fusionsprotein angereichert. Die EPR-Spektren wurden bei 77 K bei einer Modulationsfrequenz von 100 kHz und einer Modulationsamplitude von 2 Gauss aufgenommen. Die Leistung der eingestrahlten Mikrowellen (9.55 GHz) betrug 19.5 mW. Für die Spektren wurden jeweils 10 Einzelmessungen gemittelt.

2.12.3 Fourier-Transformations-Infrarotspektroskopie (FTIR)

Die FTIR-spektroskopischen Messungen wurden wie in de Lacey *et al.* (2004) beschrieben durchgeführt. Als Proben dienten RH-Proteine, die als HoxJ^{INPUT}-His₆-Fusionsprotein angereichert wurden. Die Spektren wurden bei Raumtemperatur aufgezeichnet.

2.13 DNA-Grundtechniken

2.13.1 Behandlung von Geräten und Lösungen

Zur Inaktivierung von DNasen wurden alle hitzebeständigen Geräte und Lösungen 20 min bei 120 °C autoklaviert. Glaswaren wurden für fünf Stunden im Trockenschrank bei 180 °C Nukleasefrei gemacht. Nicht-autoklavierbare Lösungen wurden steril filtriert.

2.13.2 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die DNA-Konzentration wurde photometrisch ermittelt. Dabei wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm in einer Quarzküvette gemessen. Einer OD_{260nm}=1 entsprechen 50 µg/ml doppelsträngiger DNA bzw. 40 µg/ml RNA (Davis *et al.* 1980). Durch parallele Bestimmung der OD_{280nm} und der Bildung des Quotienten aus den beiden Werten kann ein Maß für die Reinheit der Nukleinsäuren gewonnen werden. Die theoretischen Werte für das Verhältnis OD_{260nm}/OD_{280nm} für reine DNA liegt bei 1.8, für

reine RNA bei 2.0 (Sambrook *et al.* 1989). Liegt der Wert unterhalb von 1.6, so ist von Proteinverunreinigungen in der Nukleinsäurelösung auszugehen. Nach der Auftrennung von Restriktionsfragmenten in Agarosegelen konnte die Konzentration einzelner Ethidiumbromid-markierter Proben durch Vergleich ihrer Fluoreszenzintensität mit denen von DNA-Fragmenten bekannter Konzentration auch ohne photometrische Messung abgeschätzt werden.

2.13.3 Konzentrierung von DNA

Die DNA-Probe wurde nacheinander mit 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat-Lösung (pH 6.5) und 2.5 Volumen 96 %igem Ethanol versetzt und für mindestens 30 min bei -20 °C inkubiert. Die Sedimentation der DNA erfolgte durch Zentrifugation (15 000 x *g*, 10 min, 4 °C; Sigma-2K15-Kühlzentrifuge). Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen des Pellets im Vakuum oder an der Luft wurde die DNA in ddH₂O resuspendiert.

2.13.4 Restriktion von DNA

Die DNA-Lösungen wurden mit 2 bis 10 U einer Restriktionsendonuklease, in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer, für 1-12 h bei der für das jeweilige Restriktionsenzym angegebenen Temperatur vollständig verdaut.

In einigen Fällen wurde den Restriktionsansätzen zur Entfernung von RNA eine RNase-Lösung in der Endkonzentration von 20 µg/ml zugesetzt. Doppelverdau mit Restriktionsenzymen, die verschiedene Puffer benötigen, erfolgten in dem Puffer, bei dem die Aktivität beider Enzyme bei 75 % lag. Lag die Aktivität unter 75 %, wurde die DNA erst mit einem Restriktionsenzym behandelt und die verdaute DNA dann im Agarosegel aufgetrennt. Die Bande mit der entsprechenden DNA wurde aus dem Gel extrahiert und dem Restriktionsverdau mit dem zweiten Enzym unterzogen. Die Aktivität der Enzyme wurde durch Zugabe des Auftragspuffers abgestoppt.

Für einen partialen Verdau mit einem mehrfach schneidenden Restriktionsenzym wurden 10-12 µg DNA in geeignetem Puffer mit 10 U Restriktionsendonuklease versetzt und 0.5 bis 10 min bei optimaler Temperatur inkubiert. Nach 0.5, 1, 2, 3, 4, 5 und 10 min wurden dem Ansatz jeweils 10 µl entnommen und zu 5 µl Auftragspuffer pipettiert. Die Proben wurden im Anschluss elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Beurteilung der partialen Restriktion wurde das Fragmentmuster der Probe mit dem unverdauter DNA verglichen. Zeigte eine der Proben das gesuchte Bandenmuster, so

wurde ein neuer Ansatz pipettiert und für die entsprechende Zeit verdaut, bei der der partielle Verdau erfolgreich war. Die gewünschte Bande im Agarosegel wurde ausgeschnitten und das DNA-Fragment daraus extrahiert.

2.13.5 Agarose-Gelelektrophorese

Für die elektrophoretische Auftrennung von DNA wurden horizontale Gelkammern verwendet. Die Gele wurden mit 0.6 bis 3 % [w/v] hochschmelzender Agarose (Invitrogen) in TPE-Elektrodenpuffer (80 mM Tris, 8 mM EDTA, pH 7.6, eingestellt mit 85 % [w/w] H_3PO_4) angesetzt. Die Elektrophorese erfolgte mit TPE-Puffer bei einer Spannung von max. 90 V für 45 bis 60 min. Vor dem Auftragen wurden die DNA-Proben mit ca. 0.2 Volumenteilen Schwerelösung (20 % [w/v] Ficoll 400, 0.07 % [w/v] Bromphenolblau) versetzt. Nach der Auftrennung wurde das Gel für 5-10 min mit einer Ethidiumbromidlösung (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) fluoreszenzmarkiert. Anschließend erfolgte eine Entfärbung in Wasser. Die DNA-Banden wurden durch einen Transilluminator sichtbar gemacht. Mit Hilfe eines Videosystems (E.A.S.Y. 429K; Herolab) und eines Druckers (CP770DW; Mitsubishi) konnten die Bandenmuster dokumentiert werden. Zur Größenbestimmung der Fragmente wurden *Bst*EII-geschnittene DNA des Phagen I (Fragmentgröße: 702-8454 Basenpaare (bp)), *Pst*I-geschnittene DNA des Phagen I (Fragmentgröße: 340-15000 bp), die 100 bp-Leiter (Invitrogen, Fragmentgröße: 100-2072 bp bzw. NEB, Fragmentgröße: 100-1517 bp) und die 1 kbp-Leiter (Invitrogen, Fragmentgröße: 500-12000 bp bzw. NEB, Fragmentgröße: 500-10000 bp) als Standards herangezogen. Das Ausschneiden der gesuchten DNA-Banden aus dem präparativen Gelen erfolgte mit einem Skalpell. Unter Verwendung eines kommerziellen Systems (QIAEX II Agarose Gel Extraction Kit, QIAGEN) wurde die DNA dann aus der Agarose eluiert.

2.13.6 Behandlung von überhängenden 5'- und 3'-DNA-Enden

Um 5'-DNA-Überhänge mit einem glatten Ende zu versehen, wurde das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase eingesetzt. Die Behandlung erfolgte in Reaktionsansätzen zu je 50 μl . Ein Ansatz enthielt bis zu 10 μg DNA, 5 μl 10fach konzentriertem Klenow-Puffer (500 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl_2 , 1 M NaCl, 5 mM Dithiothreitol, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BSA, pH 7.5), je 5 μl der vier Desoxyribonuklosidtriphosphate (dNTP's; je 25 mM in ddH_2O , pH 7.0) und 2-4 U Klenow-Polymerase und wurde für 30-45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dieser Zeit erfolgte die Hitzeinaktivierung

der Polymerase für 20 min bei 70 °C. Um die Polymerase aus der DNA zu entfernen, musste der Ansatz zur Fragmentisolierung erneut einer präparativen Gelelektrophorese unterzogen werden.

2.13.7 Dephosphorylierung von DNA

Zur Verringerung von inter- und intramolekularen Reaktionen der Vektorfragmente in Ligationsansätzen wurden deren endständige Phosphatgruppen durch einen Dephosphorylierungsschritt entfernt. Die Reaktionsansätze enthielten in einem Volumen von 70 µl bis zu 20 µg DNA, 7 µl 10fach Phosphatase-Puffer (200 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, pH 8.0) und 1 U alkalische Phosphatase (CIP-AP, NEB). Statt des Phosphatasepuffers wurden auch die Puffer 1 bis 4 (NEB) verwendet. Die Dephosphorylierung erfolgte für 1 bis 12 h bei 37 °C. Die Phosphatase war durch 10 minütiges Inkubieren des Ansatzes bei 65 °C inaktivierbar. Anschließend wurde der Ansatz zur Fragmentisolierung wiederum in einem präparativen Agarosegel aufgetrennt, wodurch ein Abtrennen der Phosphatase von dem DNA-Fragment möglich war.

2.13.8 Phosphorylierung von DNA

Zur Religation von inversen PCR-Produkten war es notwendig, mittels einer T4-Polynukleotidkinase (PNK) endständige Phosphatgruppen zu schaffen. Der PCR-Ansatz wurde wie im Kapitel 2.13.3 gefällt. Der Reaktionsansatz von 30 µl enthielt 15 µl gefällte DNA, 3 µl ATP (10 mM), 3 µl 10fach T4-PNK-Puffer (700 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 50 mM DTT, pH 7.6) und 8 µl ddH₂O. Der Ansatz wurde für 5 min bei 70 °C inkubiert und anschließend für weitere 5 min bei 4 °C inkubiert. Im Anschluss daran wurde 1 U T4-PNK (NEB) hinzupipettiert und für 2 h bei 37 °C inkubiert. Zur Fragmentisolierung wurde der Ansatz in einem präparativen Agarosegel aufgetrennt, die DNA aus dem Gel extrahiert und anschließend religiert (Siehe Kapitel 2.13.5 und 2.13.9).

2.13.9 Ligierung von DNA-Fragmenten

In der Regel wurden die zu ligierenden Insertionsfragmente und Vektoren in einem Verhältnis von 2:1 eingesetzt. Ein Ligationsansatz von 30 µl enthielt 1-2 µg DNA, 3 µl Ligase-Puffer (10fach, 500 mM Tris-HCl, 100 mM MgCl₂, 100 mM DTT, 10 mM ATP,

250 µg/ml BSA, pH 7.5; NEB) und 1-2 U T4-DNA-Ligase (NEB). Die Ligation von überhängenden Enden erfolgte für 1 bis 12 h bei 16 °C im Thermogefäß. Glatte Enden wurden für 1 bis 12 h bei Raumtemperatur ligiert.

2.13.10 Plasmid-Transfer

2.13.10.1 Transformation

Als Rezipient freier Plasmid-DNA wurden die Stämme *E. coli* JM109 und *E. coli* S17-1 eingesetzt. Die Durchlässigkeit der Plasmid-DNA kann durch chemische Behandlung der Zellen erhöht werden (Hanahan 1983).

Für die Herstellung kompetenter Zellen wurden 150 ml LB-Medium mit 0.5 ml einer frischen Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C bis zum Erreichen einer OD_{600nm} von 0.5 bis 0.6 geschüttelt. Die Suspension wurde in sterile Zentrifugenröhrchen überführt und 15 min bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet (4000 U/min, 20 min, 4 °C; Sigma 3K-1). Das Zellpellet wurde in 100 ml eiskalter steril filtrierter RF1-Lösung (100 mM RbCl, 50 mM MnCl₂, 30 mM K-Acetat, 10 mM CaCl₂, 15 % [v/v] Glycerin, pH 5.8 mit Eisessig eingestellt) resuspendiert und für 30 min bei 4 °C inkubiert. Das nach erneuter Zentrifugation entstandene Pellet wurde mit 24 ml eiskalter RF2-Lösung (10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl₂, 15 % [v/v] Glycerin, pH 5.8 mit NaOH eingestellt, steril filtriert) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in 200 µl Portionen aliquotiert, in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Zur Transformation mussten die Zellen bei 4 °C aufgetaut und mit 10-100 ng DNA versehen werden. Nach vorsichtigem Mischen wurde der Ansatz 30 min bei 4 °C inkubiert, um ein Anheften der DNA an die Membranen zu ermöglichen. Der darauf folgende Hitzeschock (3 min, 42 °C) führte zur Aufnahme der DNA. Nach Zugabe von 0.6 ml LB-Medium zum Transformationsansatz wurde dieser für 45-60 min bei 37 °C inkubiert. Abschließend erfolgte das Ausplattieren von 100 und 200 µl des Ansatzes auf Selektivagar (Antibiotika) und die Inkubation bei 37 °C für 12 h.

2.13.10.2 Elektrotransformation

Die bei der Elektroporation verwendeten *E. coli*-Zellen mussten in einem salzarmen Medium vorliegen. 200 ml auf 37 °C vorgewärmtes LB-Medium wurden mit 4 ml einer frischen Vorkultur von *E. coli* JM109 bzw. S17-1 beimpft. Die Kultur wurde bis zum Erreichen einer OD_{600nm} von 0.6 bei 37 °C geschüttelt und vor der Ernte (4000 U/min, 20 min, 4 °C; Sigma 3K-1) für 15 min bei 4 °C inkubiert. Der Zellernte schloss sich ein

dreifacher Waschschrift mit je 25 ml eisgekühltem ddH₂O an. Die Zellpellets wurden in 400 µl frischen, eisgekühlten ddH₂O resuspendiert und mit Glycerin zu einer Endkonzentration von 10 % [v/v] versetzt. Die Zellsuspension wurde in 100 µl-Aliquots aufgeteilt und bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert.

Die eingefrorenen Zellen wurden für die Elektroporation bei 4 °C aufgetaut. Dann erfolgte die Zugabe von 5 µl DNA-Lösung (bis 1 µg DNA/ml ddH₂O). Nach dem Mischen der DNA mit den kompetenten Zellen wurde der Ansatz in 2 mm-Elektroporationsküvetten (peqlab) gefüllt und für eine Minute auf Eis gestellt. Die Küvette mit dem Zell-DNA-Gemisch wurde in einen Gene-Pulser (Easyject PRIMA, peqlab) gestellt. Die Elektroporation erfolgte bei 2500 V, mit einer Kapazität von 25 µF und einem Widerstand von 200 Ω. Sofort im Anschluss an das Pulsen wurde 1 ml SOC-Medium (10 g Trypton, 2.5 g Hefeextrakt, 0.25 g NaCl, ad 425 ml ddH₂O, 10 ml 1 M Glukose) zu der Zellsuspension pipettiert und der Ansatz in ein 1.5 ml Eppendorfgefäß überführt, welches für 60 min bei 30 °C inkubiert wurde. Abschließend erfolgte das Ausplattieren von 100 und 200 µl des Ansatzes auf Selektivagar (Antibiotika) und die Inkubation bei 37 °C für 12 h.

2.13.10.3 Konjugation

Durch konjugativen Transfer wurden mobilisierbare Plasmide vom Donor *E. coli* S17-1 in den Rezipienten *R. eutropha* übertragen. Spender und Empfänger wurden in 10 ml LB- bzw. FN-Medium mit den entsprechenden Antibiotika angezogen. Die Zellen wurden geerntet und in sterilem H16-Puffer gewaschen. Die Zellpellets wurden in 1 ml H16-Puffer resuspendiert. Mit einer Glaspipette wurden 100 µl Donor-Zellsuspension aufgezogen und in drei parallelen Strichen auf Selektivagar übertragen. Nach kurzem Antrocknen der Zellen wurde die Rezipienten-Zellsuspension im rechten Winkel dazu aufgetragen. Der Impfstrich wurde durch alle drei Donor-Striche gezogen. Für jeden Strich wurde eine neue Pipette verwendet. Die Agarplatte wurde 1-2 Tage bei 30 °C inkubiert. Danach konnten Einzelkolonien, die sich an den Kreuzstellen zwischen Donor- und Rezipienten-Impfstrich gebildet hatten, auf Antibiotika-haltigen FN-Platten ausgestrichen werden. Für die rekombinante Insertion der konditional-letalen Suizidplasmid-Derivate in das Genom von *R. eutropha* wurden die beiden Zellsuspensionen nach dem Waschschrift im Verhältnis 1:1 gemischt und 0.2 ml dieses Gemisches wurden auf einer LSLB-Platte ausplattiert ("spot mating"-Technik). Nach 6 bis 14 stündiger Inkubation der Agarplatten bei 37 °C wurde das Zellmaterial mit einer sterilen Glaspipette vorsichtig vom Agar abgenommen und in 5 ml H16-Puffer überführt. Die Zellen wurden abzentrifugiert und in 1 ml H16-Puffer resuspendiert. Je

100 µl geeigneter Verdünnungsstufe wurden auf FN-Platten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert. Transkonjuganten waren nach 2 bis 3 Tagen Inkubation bei 37 °C sichtbar.

2.13.11 DNA-Isolierung

2.13.11.1 Plasmid-Isolierung für analytische Zwecke

Das Verfahren nach Holmes und Quigley (1981) diente der schnellen Isolierung von Plasmid-DNA zu analytischen Zwecken. Von einer Übernachtskultur wurden 1.5 ml geerntet (Biofuge 13, Heraeus) und das Zellpellet in 300 µl LSTET-Puffer (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 8 % Saccharose, 5 % Triton X-100, 0.75 mg/ml Lysozym, pH 8.0) resuspendiert. Nach 10 min Inkubation bei 4 °C wurden die Proben 1 min lang in siedendes Wasser gebracht. Die Zelltrümmer, Proteine und chromosomale DNA wurden durch Zentrifugation (13000 U/min, 30 min, 25 °C, Biofuge 13, Heraeus) abgetrennt. Das sedimentierte Pellet ließ sich mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers entfernen. Durch Zugabe von 300 µl Isopropanol und anschließender Lagerung bei -20 °C wurde die DNA gefällt. Nach 20 minütigem Zentrifugieren wurde das DNA-Pellet mit eiskaltem 70 %igen Ethanol gewaschen, für 10 min im Vakuum getrocknet und in 50 µl sterilem ddH₂O resuspendiert.

2.13.11.2 Plasmid-Isolierung für präparative Zwecke

Die Isolierung RNA-freier Plasmid-DNA für Klonierungen, Sequenzierungen und Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) erfolgte mit Hilfe eines kommerziellen Systems (QIAGEN Tip 50 bzw. Tip 100; Qiagen). Je nach Kopienzahl der Plasmide wurden 5 bis 100 ml einer frischen Übernachtskultur geerntet und nach den Angaben des Herstellers aufgearbeitet. Zur Isolierung kleinerer Mengen hoch reiner Plasmid-DNA für Sequenzreaktionen wurde der "QIAprep Spin Miniprep Kit" (Qiagen) verwendet. Von einer frischen Übernachtskultur wurden 2 ml nach den Angaben des Herstellers aufgearbeitet. Diese Reinigung beruht auf der Bindung der Plasmid-DNA an eine Silicamatrix in Gegenwart von chaotropen Salzen.

2.13.12 Polymerase-Kettenreaktion

Die DNA-Amplifikation mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion erfolgte in einem "Thermocycler" (PTC-200, MJ Research, Biozym). Dabei fand folgendes Standardprogramm Anwendung:

1. Schritt: 3 min, 96 °C zum initialen Aufschmelzen der "Template"-DNA

2. Schritt: 1 min, 96 °C
3. Schritt: 1 min, 50-60 °C ("Annealing" der Oligonukleotide)
4. Schritt: 30 s bis 10 min, 68-72 °C zur Aufpolymerisierung partial einzelsträngiger Amplifikate

Die Schritte 2 bis 4 wurden in 25 bis 30 Zyklen durchgeführt. Die Reaktionsansätze hatten folgende Zusammensetzung:

- 2 µl dNTP's (je 10 mM)
- bis zu 6 mM MgCl₂
- 10 µl Polymerase Puffer (10fach)
- 1 µl Oligonukleotid 1 (1 µg/µl)
- 1 µl Oligonukleotid 2 (1 µg/µl)
- 1 µl "Template"-DNA (DNA-Fragmente, Plasmid-DNA oder Zelllysate, ca. 0.5 µg/µl)
- 0.5 µl Polymerase (Taq-DNA-Polymerase, Eppendorf; Vent-Polymerase, NEB; Platinum Pfx-Polymerase, Invitrogen); 5 U/µl
- ad 100 µl ddH₂O

Die PCR-Amplifikate wurden entweder über eine präparative Gelelektrophorese und anschließender Gelextraktion (siehe Kapitel 2.13.5) oder mit Hilfe des "QIAquick PCR Purification Kit Protocol" (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers gereinigt.

2.13.13 DNA-Sequenzierung

2.13.13.1 Sequenzreaktion

Zur Sequenzierung doppelsträngiger DNA wurde ein kommerzielles System (Thermo Sequenase sequencing kit with 7-deaza-dGTP, Amersham Biosciences) verwendet. Die dNTP's sind dabei am 5'-Ende mit dem fluoreszierenden Farbstoff IRD41 markiert. Die Oligonukleotide wurden mit Hilfe eines automatischen Sequenziergerätes (Li-COR dna-sequencer model 4000, MWG-BIOTECH) detektiert. Je 5 µl DNA (0.5 µg/µl) wurden mit 1 µl Primer (2 pmol/µl) und 2.5 µl A-, C-, G-, T-Reagenz für die Sequenzreaktion gemischt, mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet und anzentrifugiert. Die Reaktion im PCR-Gerät (PTC-200 MJ Research, Biozym) lief nach folgendem Programm ab:

1. Denaturieren der DNA bei 96 °C, 3 min
2. Denaturieren bei 96 °C, 30 s
3. Oligonukleotid-Bindung bei 50 bis 60 °C (2 °C unterhalb des Schmelzpunktes des Oligonukleotids), 30 s
4. Polymerisieren bei 72 °C, 1 min

Die Schritte zwei bis vier durchliefen 25 Zyklen.

Beendet wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 µl Stopp-Mix (95 % [w/v] Formamid, 20 mM EDTA, 0.05 % [w/v] Bromphenolblau, 0.05 % [w/v] Xylencyanol FF). Zur Vorbereitung der Elektrophorese wurden die Proben für 5 min bei 96 °C denaturiert und anschließend bis zum Probenauftrag auf Eis gestellt. Zu sequenzierende DNA-Fragmente wurden in pBlueskript KS+/SK-/SK+ kloniert. Die für die PCR verwendeten Primer "universal" und "reverse" binden an spezifischen Regionen dieser Vektoren.

2.13.13.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von markierten Oligonukleotiden erfolgte in Vertikal-Gelkammern. Ein 0.25 mm dickes Gel (25 x 41 cm) wurde aus einer Fertiglösung mit 6 % [w/v] Acrylamid und 7 M Harnstoff (Sequagel XR, National Diagnostics) hergestellt. Als Elektrophorese-Puffer diente TBE-Puffer (89 mM Tris-HCl, 89 mM Borsäure, 2.5 mM EDTA, pH 8.3). Nach einem Vorlauf von 1 h wurden 0.75 bis 1 µl der Proben auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung und Detektion der DNA-Fragmente erfolgte durch ein automatisch arbeitendes Sequenziergerät (Li-COR dna-sequencer model 4000, MWG-BIOTECH) bei einer Stromstärke von 35 mA. Das Gel wurde auf konstant 50 °C temperiert. Oligonukleotide in den Größen von 150-1500 bp wurden aufgetrennt und über die fluoreszenzmarkierten Nukleotide detektiert. Die Aufzeichnung und Verarbeitung der Daten erfolgte mit dem Programm Baselmag IR v4.0 (Li-COR). Die Daten wurden automatisch analysiert und bei Bedarf entsprechend durch manuelle Auswertung der Sequenzabschnitte ergänzt.

2.14 Genetische Konstruktionen

Genetische Veränderungen an Plasmiden wurden in *E. coli* S17-1 etabliert. Zur Herstellung von Aminosäure-Austauschmutanten in der RH von *R. eutropha* wurden einzelne Basen mit Hilfe der PCR und der so genannten „drei-Primer-Technik“ erzeugt (Chen & Przybyla 1994). Bei Gen-Deletionen wurde die Nukleotidsequenz der Fusionsstelle durch Sequenzierung überprüft. PCR-generierte DNA-Fragmente wurden vollständig sequenziert.

Der Austausch von Allelen erfolgte durch homologe Rekombination. Dafür stand der Vektor pLO2 zur Verfügung, der auf dem ColEI-Replikon basiert und neben dem *neo*-Gen für eine Kanamycinresistenz auch das *sacB*-Gen aus *Bacillus subtilis* trägt, welches für eine Laevan-Saccharase kodiert. Die pLO-Vektoren sind von *E. coli* S17-1 nach *R. eutropha* mobilisierbar (mob+) und können nach erfolgreicher Integration in das Rezipientengenom replizieren. Eine erfolgreiche Rekombination wurde mittels PCR

(Kap. 2.13.12) bestätigt. Zur Erzeugung transkonjuganter Stämme wurde der mobilisierbare Weitwirtsbereichs-Vektor pEDY309 verwendet, der in *R. eutropha* stabil repliziert.

2.14.1 Nukleotidaustausche in *hoxC*

Für die Mutagenese von *hoxC* wurde das Plasmid pCH397 eingesetzt, das ein 3.3 kb *Pst*I-Fragment mit der *hoxBC*-Region trägt. Es diente in allen folgenden PCR-Reaktionen als „Template“-DNA. Nach der Klonierung in den Vektor pBlueskript SK+ wurde die Richtigkeit der amplifizierten DNA-Fragmente durch vollständiges Sequenzieren kontrolliert. Für die Sequenzreaktion standen die IRD 800-markierten Sequenzprimer M13-Universal (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3', MWG-Biotech) und M13-Reverse (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3', MWG-Biotech) zur Verfügung. Für die Überproduktion der RH-Mutantenproteine in *R. eutropha* wurde auf ein bereits etabliertes Expressionssystem zurückgegriffen. Die Grundlage bildet das Plasmid pCH594, welches den SH-Promotor und die Gene *hoxBC* von *R. eutropha* trägt (Kleihues *et al.* 2000). Durch einen *Bgl*II/*Bam*HI-Verdau und anschließendes Religieren wurde die *Eco*RI-Schnittstelle aus dem Polylinker von pCH594 eliminiert. Das so konstruierte Plasmid war um 57 bp kleiner als pCH594 und erhielt die Bezeichnung pCH861 (Buhrke *et al.* 2002).

Die durch die PCR erhaltenen und durch Sequenzierung kontrollierten Mutationen in *hoxC* wurden durch Austausch der entsprechenden DNA-Fragmente in pCH861 inseriert und anschließend als P_{SH} -*hoxBC*-Region in pEDY309 transferiert. Die Expressionsplasmide wurden über konjugativen Transfer von *E. coli* S17-1 in *R. eutropha* HF574 übertragen.

2.14.1.1 HoxC R411

Für den Austausch des Arginins an der Position 411 von HoxC durch Lysin bzw. Leucin wurde in einer ersten PCR das Oligonukleotid #*hoxC*-3975 fw (5'-CTCGACGCGCTTGATCTTGC-3') mit den mutagenen Oligonukleotiden #*hoxC* R/L (5'-GTGCCCCAGGCTGCC**AG**CGCCGCCTCCGT-3') und #*hoxC* R/K (5'-GTGCCCCAGGCTGCC**CTT**CGCCGCCTCCGT-3') verwendet. Es wurden 0.41 kb PCR-Produkte isoliert, die als Primer zusammen mit dem Oligonukleotid #169 (5'-GCCTCGTGCGCCTCGCGCAA-3') in einer zweiten PCR Anwendung fanden. Die entstandenen 1.3 kb großen Produkte wurden *Rsa*I/*Sa*II verdaut und als 0.90 kb-Fragmente in den *Sa*II/*Eco*RV linearisierten Vektor pBlueskript SK+ inseriert. Mit den resultierenden Plasmiden pCH978 und pCH980 ließ sich die Richtigkeit der

amplifizierten DNA durch Sequenzieren überprüfen. Die 0.93 kb *Sall*/*SpeI*-Fragmente aus den Plasmiden pCH978 und pCH980 wurden jeweils in den *Sall*/*SpeI* geschnittenen Vektor pCH594 bzw. pCH861 kloniert. Aus den resultierenden Plasmiden pCH981 und pCH982 wurden 3.2 kb *SpeI*/*HindIII*-Fragmente herausgeschnitten und in den *HindIII*/*SpeI* linearisierten pEDY309 kloniert. Auf diese Weise entstanden die Expressionssysteme pGE512 und pGE511.

2.14.1.2 HoxC V12

Für den Austausch des Valins an der Position 12 von HoxC durch Alanin bzw. Isoleucin wurde in einer ersten PCR das Oligonukleotid #*hoxB* Del2 (5'-CTGCCGGTGATCAATGTCGCCGGTTGCCCG-3') mit den mutagenen Oligonukleotiden #*hoxC* V12A (5'-CACCTCGAGGTCGCCCTC**AGC**GCGGTTGAA-3') und #*hoxC* V12I (5'-CACCTCGAGGTCGCCCTC**AAT**GCGGTTGAA-3') verwendet. Es wurden 0.6 kb PCR-Produkte isoliert, die als Primer zusammen mit dem Oligonukleotid #18651 rev (5'-TCACGCCGGCAAGATCCGCCAATGCGCGGC-3') in einer zweiten PCR Anwendung fanden. Die entstandenen 0.79 kb großen Produkte wurden *SacII* verdaut und als 0.36 kb-Fragmente in den *SacII* linearisierten Vektor pBlueskript SK+ inseriert. Mit den resultierenden Plasmiden pCH991 und pCH992 ließ sich die Richtigkeit der amplifizierten DNA durch Sequenzieren überprüfen. Die 0.36 kb *SacII*-Fragmente aus den Plasmiden pCH991 und pCH992 wurden jeweils in den *SacII* geschnittenen Vektor pCH861 umklontiert. Aus den resultierenden Plasmiden pCH1030 und pCH1034 wurden 2.8 kb *SpeI*/*HindIII*-Fragmente herausgeschnitten und in den *SpeI*/*HindIII* linearisierten Weitwirtsbereichs-Vektor pEDY309 kloniert. Auf diese Weise entstanden die Expressionssysteme pGE540 und pGE541.

2.14.1.3 HoxC E13

Der Austausch des Glutamats an der Position 13 von HoxC durch Glutamin bzw. Leucin erfolgte in einer ersten PCR mit dem Oligonukleotid #*hoxB* Del2 (5'-CTGCCGGTGATCAATGTCGCCGGTTGCCCG-3') und den mutagenen Oligonukleotiden #*hoxC* E13Q (5'-CACCTCGAGGTCGCCT**TGA**ACGCGGTTGAA-3') und #*hoxC* E13L (5'-CACCTCGAGGTCGCCT**AGA**ACGCGGTTGAA-3'). Es wurden 0.6 kb PCR-Produkte isoliert, die als Primer zusammen mit dem Oligonukleotid #18651rev (5'-TCACGCCGGCAAGATCCGCCAATGCGCGGC-3') in einer zweiten PCR Anwendung fanden. Die entstandenen 0.79 kb großen Produkte wurden *SacII* verdaut und als 0.36 kb-Fragmente in den *SacII* linearisierten Vektor pBlueskript SK+ inseriert. Mit den resultierenden Plasmiden pCH993 und pCH1032 ließ sich die Richtigkeit der amplifizierten DNA durch Sequenzieren überprüfen. Die 0.36 kb *SacII*-

Fragmente aus den Plasmiden pCH993 und pCH1032 wurden jeweils in den *SacII* geschnittenen Vektor pCH861 umklont. Aus den resultierenden Plasmiden pCH1035 und pCH1036 wurden 2.8 kb *SpeI/HindIII*-Fragmente herausgeschnitten und in den *SpeI/HindIII* linearisierten Weitwirtsbereichs-Vektor pEDY309 kloniert. Auf diese Weise entstanden die Expressionssysteme pGE539 und pGE542.

2.14.1.4 HoxC D15

Für den Austausch des Aspartatrestes an der Position 15 von HoxC durch Histidin bzw. Leucin wurde in einer ersten PCR das Oligonukleotid *#hoxB* Del2 (5'-CTGCCGGTGATCAATGTCGCCGGTTGCCCCG-3') mit den mutagenen Oligonukleotiden *#hoxC* D15H (5'-CACCTCGAGGT**G**GCCCTCAACGCGGTTGAA-3') und *#hoxC* D15L (5'-CACCTCGAGG**A**GGCCCTCAACGCGGTTGAA-3') verwendet. Es wurden 0.6 kb PCR-Produkte isoliert, die als Primer zusammen mit dem Oligonukleotid *#18651 rev* (5'-TCACGCCGGCAAGATCCGCCAATGCGCGGC-3') in einer zweiten PCR Anwendung fanden. Die entstandenen 0.79 kb großen Produkte wurden *SacII* verdaut und als 0.36 kb-Fragmente in den *SacII* linearisierten Vektor pBlueskript SK+ inseriert. Mit den resultierenden Plasmiden pCH989 und pCH1029 ließ sich die Richtigkeit der amplifizierten DNA durch Sequenzieren überprüfen. Die 0.36 kb *SacII*-Fragmente aus den Plasmiden pCH989 und pCH1029 wurden jeweils in den *SacII* geschnittenen Vektor pCH861 umklont. Aus den resultierenden Plasmiden pCH990 und pCH1037 wurden 2.8 kb *SpeI/HindIII*-Fragmente herausgeschnitten und in den *SpeI/HindIII* linearisierten Weitwirtsbereichs-Vektor pEDY309 kloniert. Auf diese Weise entstanden die Expressionssysteme pGE538 und pGE543.

Ein 0.4 kb *NaeI*-Fragment aus pCH990 wurde in den ebenfalls mit *NaeI* geschnittenen Vektor pLO2 kloniert. Durch den Einsatz des resultierenden Plasmids pCH1043 zur homologen Rekombination entstand aus *R. eutropha* HF433 der neue Stamm HF657.

2.14.2 In-Frame-Deletionen innerhalb der RH-Strukturgene

2.14.2.1 HoxC[ΔQ244-A268]

Als Template für alle durchgeführten PCRs wurde das Plasmid pCH861 verwendet. Mit Hilfe der beiden mutagenen Primer *#hoxC* *EcoRV rev* (5'-**ACCGATATCCAGCGCCGCATCCTGCGC**-3') und *#hoxC* *SpeI PmlI* (5'-**GGACTAGTCCGCTCAG**CACGTGTGAATGCCACGATGTACCGCG-3') wurde zunächst ein PCR-Produkt erstellt, welches dann *SpeI/EcoRV* verdaut wurde. Das resultierende 0.65 kb-Fragment ließ sich in das *SpeI/EcoRV* linearisierte Plasmid

pBlueskript SK+ integrieren. Das resultierende Plasmid pCH1040 wurde mit den Restriktionsendonukleasen *Apal* und *EcoRV* aufgetrennt und ein weiteres 0.37 kb *Apal/HypCH4V* verdautes PCR-Produkt inseriert. Für letzteres PCR-Produkt wurden die Oligonukleotide *#hoxC Apal* (5'-ATGGGGCCCCGATTCTAGGGACTGTAACC-3') und *#hoxC HypCH4V* (5'-**CTGTTG**CAAGGTGTGTGGCGTAGCGCG-3') genutzt. Das neu entstandene Plasmid mit der Bezeichnung pCH1041 wurde zunächst sequenziert. Nachdem der Bereich *HoxC*[Δ Q244-A268] ohne Leserasterverschub deletiert war, wurde aus dem Plasmid pCH1041 ein 1.0 kb *Apal/PmlI*-Fragment herausgeschnitten und in des ebenfalls *Apal/PmlI* linearisierte Plasmid pCH861 kloniert. Das resultierenden Plasmid pCH1042 wurde *SpeI/HindIII* verdaut und das entstandene 2.8 kb-Fragment mit dem *SpeI/HindIII* geschnittenen Vektor pEDY309 ligiert. Durch Konjugation ließ sich das neu entstandene Plasmid pGE546 von *E. coli* auf *R. eutropha* bertragen.

2.14.2.2 *HoxB*[Δ Q155-L162]

Mit Hilfe der Primer *#hoxB FseI rev* (5'-CGAGGCCGGCCCCAGGGTATCCAGG-3') und *#hoxB RsrII* (5'-GCGCGGTCCGCATGGTACCGGGCG-3'), sowie der beiden mutagenen Primer *#hoxB HpaI* (5'-**CTGGTTA**ACTACCGCTCACGCGCCGGC-3') und *#hoxB EcoRV* (5'-**GGCGATA**TCCCCCTCGTATTGCAGGCC-3') wurden zwei PCR-Produkte hergestellt. Als Template diente das Plasmid pCH594. Die 0.14 kb *FseI/HpaI*- und 0.18 kb *RsrII/EcoRV*-Fragmente wurden in einer 3-Fragmentligation mit dem *FseI/RsrII* geschnittenen Plasmid pCH594 verbunden. Das resultierende Plasmid trug die Bezeichnung pCH1031 und enthielt eine acht Aminosäuren umfassende Deletion in *hoxB* (Δ Q155-L162). Um die Deletion zu kontrollieren wurde ein 0.55 kb *EcoRI/PstI*-Fragment aus dem Plasmid pCH1031 herausgeschnitten und in pBlueskript SK+ kloniert. Nachdem die Sequenzierung ergab, dass die Deletion in *hoxB* erfolgreich war, wurde ein 2.8 kb *SpeI/HindIII*-Fragment aus dem Plasmid pCH1031 in den *SpeI/HindIII* linearisierten Vektor pEDY309 kloniert. ber konjugativen Transfer wurde das resultierende Plasmid pGE544 aus *E. coli* nach *R. eutropha* bertragen.

2.14.2.3 *HoxB*[Δ Q155-S166]

Mit Hilfe der Primer *#hoxB FseI rev* (5'-CGAGGCCGGCCCCAGGGTATCCAGG-3') und *#hoxB RsrII* (5'-GCGCGGTCCGCATGGTACCGGGCG-3'), sowie der beiden mutagenen Primer *#hoxB Nrul* (5'-**GGTTCGCGA**CCGGCCTGCCGGTGATC-3') und *#hoxB EcoRV* (5'-**GGCGATA**TCCCCCTCGTATTGCAGGCC-3') wurden zwei PCR-Produkte hergestellt. Als Template diente das Plasmid pCH594. Die 0.13 kb *FseI/Nrul*- und 0.18 kb *RsrII/EcoRV*-Fragmente wurden in einer 3-Fragmentligation mit dem *FseI/*

RsrII geschnittenen Plasmid pCH594 verbunden. Das resultierende Plasmid trägt die Bezeichnung pCH1038 und enthält eine zwölf Aminosäuren umfassende Deletion in *hoxB* (Δ Q155-S166). Um die Deletion zu kontrollieren, wurde ein 0.55 kb *EcoRI/PstI*-Fragment aus dem Plasmid pCH1038 herausgeschnitten und in pBlueskript SK+ kloniert. Nachdem die Sequenzierung die erfolgreiche Deletion in *hoxB* bestätigte, wurde ein 2.8 kb *SpeI/HindIII*-Fragment aus dem Plasmid pCH1038 in den *SpeI/HindIII* linearisierten Vektor pEDY309 kloniert. Über konjugativen Transfer wurde das resultierende Plasmid pGE545 aus *E. coli* nach *R. eutropha* übertragen.

2.14.3 Konstruktion der RH-*Strep*-tag

Für das Einfügen eines *Strep*-tags (IBA, Schmidt *et al.* 1996) C-terminal an die kleine Untereinheit HoxB der RH und die anschließende Überexpression wurde eine inverse PCR mit dem mutagenen Oligonukleotid #*hoxB Strep-tag II* (5'-**TCCTATTTTTCGAACTGCGGGTGGCTCCAAGCAG**ATTCAGCCGCGTCTTGCGAATGGCTGGCGCGATCAGCGG-3') und dem mutagenen Primer #*hoxC5'-BseRI* (5'-GG**AGAGCATGGAACGTTTGGTGGTGGGGCC**-3') durchgeführt. Als Template diente das Plasmid pCH594, welches die Gene *hoxBC* unter der Kontrolle des SH-Promotors enthielt. Das 5.6 kb große PCR-Fragment wurden zunächst phosphoryliert und anschließend religiert. Aus dem erhaltenen Plasmid pCH984 wurde ein 0.4 kb *SacII*-Fragment herausgeschnitten und in das mit *SacII* geöffnete Plasmid pCH594 inseriert. Aus dem resultierenden Plasmid pCH985 wurde der Bereich P_{SH} -*hoxB_{Strep}*-*hoxC* als 2.8 kb *SpeI/HindIII*-Fragment herausgeschnitten und in den ebenfalls *SpeI/HindIII* linearisierten Vektor pEDY309 kloniert. Das neu entstandene Überexpressionssystem wurde mit pGE513 bezeichnet und über konjugativen Transfer von *E. coli* S17-1 nach *R. eutropha* übertragen.

Die gleiche Verfahrensweise wurde bei den Aminosäure-Austauschmutanten HoxC[R411K] bzw. HoxC[R411L] angewendet, um einen *Strep*-tag II an den C-Terminus von HoxB anzufügen. Das 0.4 kb *SacII*-Fragment aus dem Plasmid pCH984 wurde in die *SacII* verdauten Plasmide pCH981 und pCH982 integriert, was zur Bildung der Plasmid pCH986 und pCH987 führte. Dort wurden wiederum 2.8 kb *SpeI/HindIII*-Fragmente heraus gelöst und in den *SpeI/HindIII* geschnittenen Weitwirtsbereichs-Vektor pEDY309 kloniert. Die neu entstandenen Plasmide bekamen die Bezeichnung pGE515 bzw. pGE516 und wurden konjugativ von *E. coli* S17-1 nach *R. eutropha* übertragen.

2.15 Dokumentation und Datenverarbeitung

Gefärbte Polyacrylamidgele und Immunoblots wurden zur Dokumentation mittels eines Scanners (UMAX Powerlook II) erfasst. Mit Hilfe der Bildbearbeitungsprogramme Photoshop (Adobe) und The GIMP (v. 2.2.14; www.gimp.org) wurde eine Tonwertkorrektur durchgeführt und, wenn notwendig, Helligkeit und Kontrast variiert. Aminosäuresequenzvergleiche wurden unter Verwendung von Daten aus der BLAST-Datenbank des National Center for Biotechnology Information, USA, (www.ncbi.com) durchgeführt. Zur Berechnung und Darstellung der Raumstruktur der [NiFe]-Hydrogenase von *D. gigas* (fvh2, Brookhaven Data Bank) wurde das Programm Rasmol Berkly (Schulz 1992) benutzt. Die Textverarbeitung erfolgte mit OpenOffice.org (v. 2.3, www.openoffice.org).

2.16 Chemikalien und Enzyme

Chemikalien und Biochemikalien wurden von den Firmen VWR International (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (München) bezogen. Restriktionsendonukleasen und andere DNA-modifizierende Enzyme lieferten die Firmen New England Biolabs (Frankfurt), Invitrogen (Karlsruhe), Roche (Mannheim) und Promega (Mannheim). Oligonukleotide wurden von den Firmen Metabion (Martinsried) und MWG Biotech (München) geliefert. Die Ultrafiltrationseinheiten lieferte die Firma Millipore (Eschborn). Die Firma Qiagen (Hilden) stellte die Kits für die Isolierung von Plasmid-DNA. Gase wurden von der Firma Air Liquide (Berlin) bezogen. Chromatographiematerialien wurden von den Firmen Amersham Bioscience (GE Healthcare Europe GmbH, München) und IBA (Göttingen) genutzt. Das verwendete und mit ddH₂O bezeichnetes Wasser wurde einer Reinstwasseranlage (Milli-Qpuls PF-Filter, Widerstand von 18 MΩcm; Millipore) entnommen.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung von Reinigungstechniken für die RH

3.1.1 Reinigung der RH durch hydrophobe Interaktion und Anionenaustausch-Chromatographie

Ziel der Arbeit war es, weitere Erkenntnisse über die Interaktion des NiFe-Kofaktors mit der Proteinumgebung zu gewinnen und Aufschluss über einen postulierten zusätzlichen Kofaktor zu erhalten. Zu diesem Zweck wurden große Mengen möglichst reinen RH-Proteins benötigt. Erste Methoden der RH-Reinigung wurden zuvor von Bernhard *et al.* (2001) beschrieben. Danach wird der lösliche Extrakt zunächst einer Hitzefällung in Gegenwart von H₂ und anschließend einer Ammoniumsulfat-Fällung unterzogen. Der resultierende klare Überstand wird dann für hydrophobe Interaktionschromatographie und Anionenaustausch-Chromatographie verwendet. RH-haltige Fraktionen werden zusammengefasst und auf ein Volumen unter 1 ml eingengt.

In dieser Arbeit wurde von 90 g Zellnassgewicht ausgegangen und nach der beschriebenen Methode die RH mit einem Ertrag von 0.7 mg gereinigt (Tabelle 7 A).

Tab. 7: Anreicherung der RH mit verschiedenen Methoden

Reinigungsschritt	Gesamtprotein [mg]	Gesamtaktivität [U]	Spezifische Aktivität ^(a) [U/mg]	Ausbeute [%]	Anreicherungs-faktor ^(b)
(A) Herkömmliche Reinigung HF371(pGE378), 90 g Zellen, (HoxBC)₂					
löslicher Extrakt	2767	30.4	0.011	100	-
Hitzefällung	930	9.3	0.010	30.6	0.9
Ammoniumsulfat-Fällung	745	12.7	0.017	41.8	1.5
ET-Säule	4.6	3.3	0.720	10.9	65.5
HQ-Säule	0.7	0.8	1.100	2.7	100.0
(B) His-tag-Reinigung HF574(pGE378), 30 g Zellen, (HoxBC)₂-HoxJ^{Input}-His₆					
Löslicher Extrakt	3822	72.6	0.019	100	-
Ni-NTA-Superflow	21	6.1	0.290	8	15
(C) Strep-tag-II-Reinigung HF574(pGE513), 30 g Zellen, (HoxB_{Strep}-HoxC)₂					
Löslicher Extrakt	650	11.5	0.018	100	-
Streptactin-Superflow	0.6	0.4	0.740	3.8	41.1

^(a) Die H₂-oxidierende Aktivität wurde amperometrisch mit Methylenblau als Elektronenakzeptor gemessen.

^(b) Es wurde das RH-Doppeldimer angereichert.

Da eines der ursprünglich verwendeten Chromatographie-Materialien nicht mehr lieferbar war und sich entsprechende Materialien von anderen Anbietern als ungeeignet erwiesen, mussten im weiteren Verlauf der Arbeit neue Möglichkeiten der RH-Reinigung gesucht werden. Dazu bot sich zum einen die Anreicherung der RH durch die Komplexbildung mit dem HoxJ^{Input}-His₆-Fusionsprotein und zum anderen die Reinigung der RH mittels der *Strep*-tag-II-Technik an.

3.1.2 Anreicherung der RH durch Komplexbildung mit dem HoxJ^{Input}-His₆-Fusionsprotein

Durch gezielte Ausnutzung der Interaktion zwischen den RH-Mutantenproteinen und der Histidin-Proteinkinase HoxJ und der damit verbundenen Bildung eines relativ stabilen RH-HoxJ-Komplexes gelang es, sowohl die Wildtyp-RH als auch die Mutantenproteine anzureichern (Buhrke *et al.* 2004). Aus vorangegangenen Experimenten ist bekannt, dass für die Komplexbildung der RH mit der Histidin-Proteinkinase sowohl die C-terminale Extension an HoxB als auch die Input-Domäne von HoxJ essentiell sind (Buhrke *et al.* 2004).

Die Input-Domäne von HoxJ lag als Hexahistidin-Fusionsprotein vor (Buhrke *et al.* 2004). Zur Anreicherung des HoxJ^{Input}-His₆-Proteins wurde der Stamm *E. coli* JM109(pCH971) in Komplexmedium bei 30 °C angezogen. Nach der Überproduktion des HoxJ^{Input}-His₆-Proteins durch Zugabe von IPTG wurden die Zellen geerntet und daraus löslicher Extrakt hergestellt, der auf die Ni-NTA-Affinitätsmatrix aufgetragen wurde. Zu diesem immobilisierten HoxJ^{Input}-Protein wurde löslicher RH-haltiger Extrakt aus *R. eutropha* gegeben. In einem anschließenden Schritt ließ sich der RH-HoxJ^{Input}-Komplex eluieren. Wie aus der Anreicherungstabelle ersichtlich (Tab. 7 B), ist die Ausbeute dieser an einem Tag durchzuführende Methode dreifach höher als die drei Tage dauernde herkömmliche Reinigungstechnik. Im Vergleich zur konventionellen Methode ließ sich die RH über die His-tag-Affinitätschromatographie nur zu einem Sechstel anreichern und die spezifische Aktivität betrug nur ein Drittel.

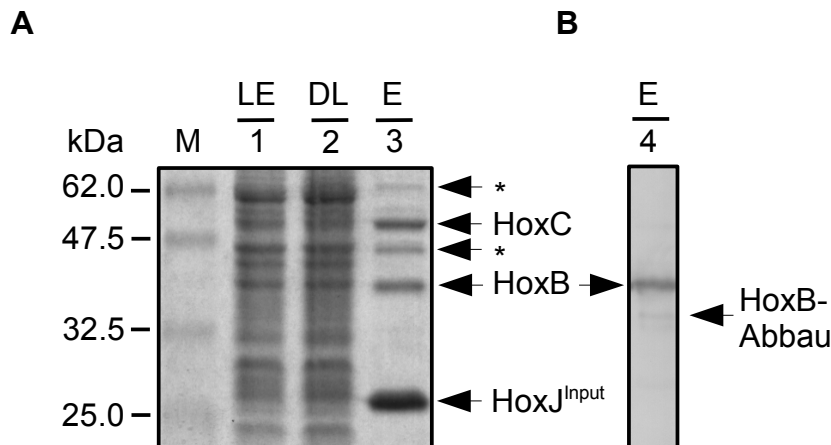


Abb. 8: Anreicherung der Wildtyp-RH unter Ausnutzung der Komplexbildung mit dem HoxJ^{Input}-His₆-Protein. Die Zellen wurden heterotroph in FGN kultiviert und daraus löslicher Extrakt hergestellt. Aliquots der einzelnen Reinigungsschritte wurde in einem 12 %igen SDS-Gel aufgetrennt. Die Proteinkonzentration pro Spur ist in Klammern angegeben. (A) SDS-PAGE und nachfolgende Coomassie-Färbung. (B) Immunoblot mit anti-HoxB Antikörper.

Spuren: 1 löslicher Extrakt von *R. eutropha* HF574(pGE377) (20 µg), 2 Säulendurchlauf (20 µg), 3 vereinigte Fraktionen nach Ni-NTA-Superflow Säule (5 µg), M Proteinstandard, * - Kontaminationen

Die Abbildung 8 zeigt den Anreicherungsverlauf für die Wildtyp-RH und dokumentiert, dass der RH-HoxJ^{Input}-Komplex zwar hoch angereichert ist, aber noch mit * markierte Verunreinigungen enthält.

Nach dem beschriebenen Verfahren wurden erstmalig auch die Mutantenproteine HoxC[R411K], HoxC[E13Q], HoxC[E13L], HoxC[V12I] und HoxC[D15H] angereichert.

3.1.3 Strep-tag-II-Technik

Die *Strep-tag-II*-Technik, die auf einer Affinitätschromatographie beruht, sollte es ermöglichen, größere Mengen reiner RH in einem Schritt zu isolieren. Über inverse PCR wurde der *Strep-tag II*, ein Peptid, bestehend aus acht Aminosäuren (WSHPQFEK) mit einer sehr hohen und selektiven Affinität zur Chromatographiematrix *Strep-Tactin*, an den C-Terminus der kleinen Untereinheit HoxB amplifiziert. Die genaue Klonierungsstrategie ist im Kapitel 2.14.3 beschrieben. Um den Nachweis einer erfolgreichen *Strep-tag*-Fusion zu führen, wurden Zellen mit und ohne *Strep-tag* versehener RH in FGN-Medium angezogen, denaturiert und im SDS-Gel aufgetrennt.

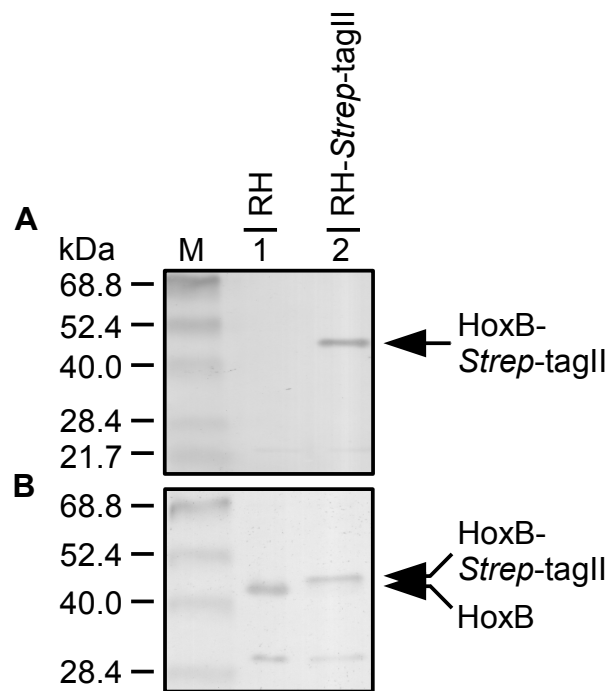


Abb. 9: Expression der RH-*Strep*-tag II. Ganze Zellen der heterotroph in FGN kultivierten Stämme *R. eutropha* HF371(pGE378) und HF574(pGE513) wurden denaturiert, im SDS-Gel aufgetrennt und anschließend geblottet. Pro Spur wurden 5 µl Zellextrakt von ganzen Zellen aufgetragen. (A): Immunoblot mit *Strep*-Tactin-Konjugat, (B) Immunoblot mit anti-HoxB Antikörper. Spuren: 1 HF371(pGE378), 2 HF574(pGE513), M Proteinstandard

Im Immunoblot konnten sowohl die *Strep*-tag-freie als auch die langsamer wandernde *Strep*-tag-haltige HoxB-Untereinheit nachgewiesen werden. Dieser Nachweis erfolgte mit Hilfe des *Strep*-Tactin-Konjugats (Abb. 9 A) und mit einem anti-HoxB Antikörper (Abb. 9 B). Der letztgenannte Immunoblot macht die Größendifferenz der beiden HoxB-Derivate deutlich.

Für die standardmäßigen Reinigungen wurden die RH-*Strep*-tag-Zellen in FGN-Medium kultiviert, geerntet und aufgeschlossen. Die Reinigung erfolgte nach einem Standardprotokoll (Material und Methoden, Kapitel 2.6). Die proteinhaltigen Fraktionen wurden im Anschluss an die Chromatographie im SDS-Gel aufgetrennt. In der Abbildung 10 A ist ein Coomassie gefärbtes SDS-Gel dargestellt und in Abbildung 10 B ist der Reinheitsgrad der vereinigten Fraktionen 4 bis 7 illustriert.

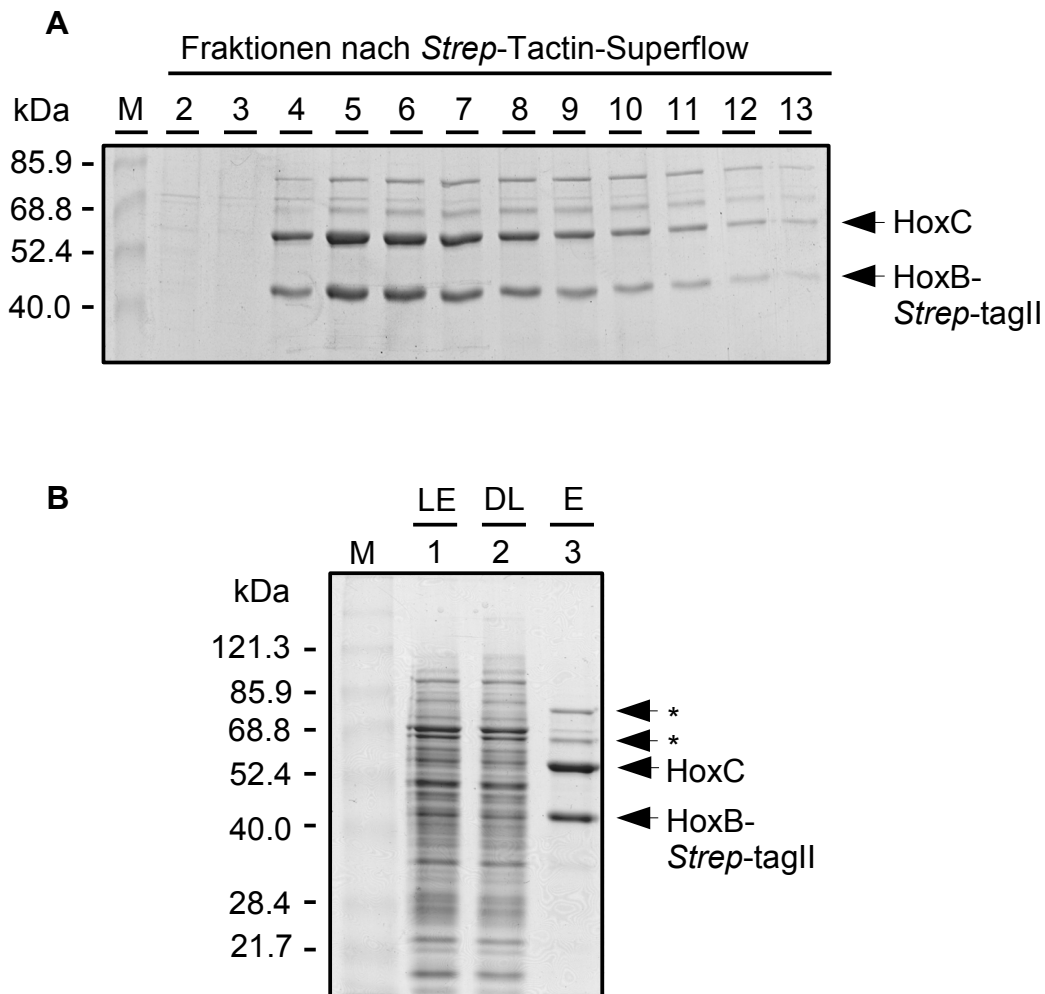


Abb. 10: Reinigungsverlauf der RH mit der *Strep*-tag-II-Technik. Die Zellen wurden heterotroph in FGN kultiviert und löslicher Extrakt hergestellt. (A) 20 µl der Eluate nach der *Strep*-Tactin-Superflow-Säule wurden in einem SDS-Gel aufgetrennt und anschließend Coomassie gefärbt. (B) Aliquots der einzelnen Reinigungsschritte wurden in einem 12 %igen SDS-Gel aufgetrennt, welches Coomassie gefärbt wurde. Die Proteinkonzentration pro Spur ist in Klammern angegeben. *Spuren*: 1 löslicher Extrakt von *R. eutropha* HF574(pGE513) (20 µg), 2 Säulendurchlauf (20 µg), 3 vereinigte Fraktionen nach *Strep*-Tactin-Superflow Säule (5 µg), *M* Proteinstandard, * - kontaminierende Proteine

In den Spuren 4 bis 11 (Abb. 10 A) sind die Banden der Untereinheiten HoxC und HoxB zu erkennen. Des weiteren sind zwei Proteine sichtbar (*), die durch ein langsames Laufverhalten als die beiden Untereinheiten der RH gekennzeichnet sind und eine Größe von 62 und 83 kDa aufweisen. Diese beiden kontaminierenden Proteine, die nicht mit dem RH-Antikörper reagieren, wurden mit Hilfe der Massenspektrometrie als Homologe von DnaK und Propionyl-CoA-(S)-methyl-malonyl-CoA-Carboxylase identifiziert (Jones et al. 2004).

Mit Hilfe der *Strep*-tag-Technologie ließ sich aus 30 g Zellen bis zu 0.6 mg reines Protein anreichern (Tab. 7 C). Der Vorteil dieser Methode gegenüber der herkömmlichen RH-Reinigung besteht darin, dass nur ein Reinigungsschritt erforderlich

ist, der wenige Stunden dauert, um reines Protein zu erhalten. Die Reinigung mit Hilfe des HoxJ^{Input}-Proteins ist vom Verlauf und der Dauer vergleichbar mit der *Strep*-tag-Technik, der Anreicherungsfaktor ist aber um den Faktor Drei niedriger. Nachteilig an der *Strep*-tag-Technik ist, dass für die Anreicherung von Mutantenproteinen eine aufwendige Klonierung notwendig wird. Dafür wurde die His-tag-Reinigung über das HoxJ^{Input}-Protein genutzt.

3.2 Das Redox-Verhalten oligomerer Formen der RH

Das bisherige Modell der Signalübertragung ging davon aus, dass H₂ an das aktive Zentrum gebunden und dabei der Ni(II)-Redox-Zustand in den Ni(III)-H⁻-Zustand übergeht. Das dabei freiwerdende Elektron wird auf die FeS-Zentren übertragen. Da in EPR-Analysen die Reduktion dieser Cluster nicht nachzuweisen war, wurde gefolgert, dass sich die einzelnen Elektronen aus dem Doppeldimer der RH (HoxBC)₂ zu einem Elektronenpaar vereinen und auf einen zwei Elektronen akzeptierenden Kofaktor übertragen werden.

Erste UV-Vis-spektroskopische Untersuchungen zeigten im Differenzspektrum (reduzierte RH minus oxidierte RH) Absorptionsmaxima bei 251 nm und bei 342 nm (Bernhard *et al.* 2001). Dies deutet auf eine Reduktion eines Endakzeptors mit H₂ hin. Der kalkulierte Extinktionskoeffizient von $\epsilon_{342}=5.36 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ und das Absorptionsmaximum bei 342 nm deuteten auf NADH als Kofaktor hin (Bernhard *et al.* 2001).

Um die Natur eines solchen postulierten Kofaktors und seine Koordination im Protein näher zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit UV-Vis-Spektroskopien mit zwei Formen der RH durchgeführt. Als Ausgangsmaterial dienten die doppeldimere RH und das RH_{Stopp}-Protein, eine um die C-terminale Extension verkürzte Version der RH (Buhrke *et al.* 2004). In der Annahme, dass diese C-terminale Verlängerung von HoxB an der Kofaktorbindung beteiligt ist, wurde zunächst das RH_{Stopp}-Protein auf das Vorhandensein eines Kofaktors untersucht. In der Tat ließen sich spektrale Unterschiede im RH_{Stopp}-Protein feststellen. Das UV-Vis-Differenzspektrum für die Wildtyp-RH zeigte ein Absorptionsmaximum bei 249 nm und ein weiteres bei 308 nm (Abb. 11 A). Dieses Spektrum besitzt eine gute Übereinstimmung mit dem an anderer Stelle beschriebenen Spektrum (Bernhard *et al.* 2001) und lässt vermuten, dass der Kofaktor in der Wildtyp-RH enthalten ist. Weder das Absorptionsmaximum bei 249 nm noch das bei 308 nm konnten mit dem RH_{Stopp}-Protein detektiert werden (Abb. 11 B),

was darauf hindeutet, dass der Kofaktor in dem RH_{Stopp}-Protein entweder inaktiv oder nicht mehr vorhanden ist. Diese Beobachtung weist darauf hin, dass die C-terminale Extension an der Koordinierung des aktiven Kofaktors beteiligt ist.

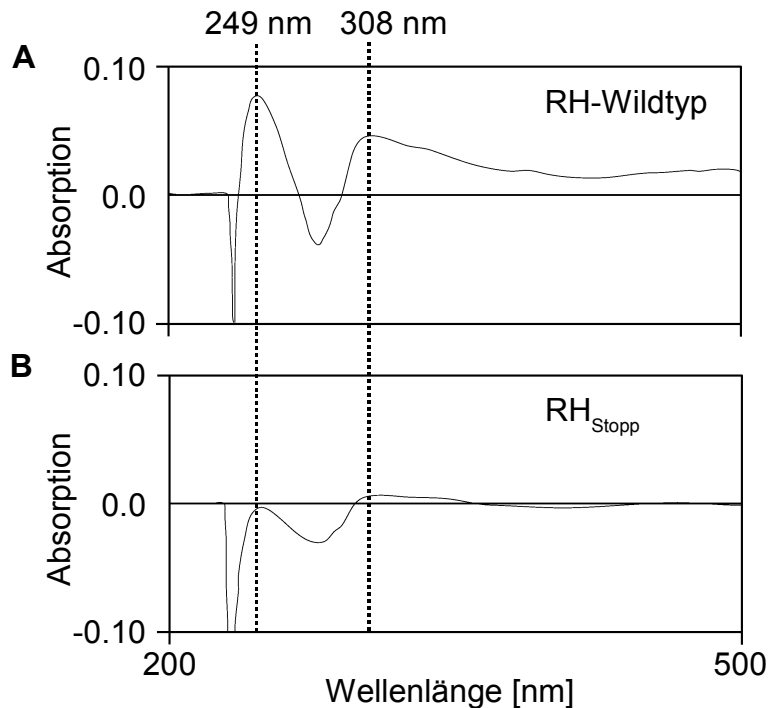


Abb. 11: Differenzspektren der reduzierten minus der oxidierten RH. (A) RH-Wildtyp, (B) RH_{Stopp}. Die gereinigten RH-Proteine wurde mit 10 mM Tris-HCl, pH 8.0 auf eine Proteinkonzentration von 0.64 mg/ml eingestellt. Die Probe wurde auf zwei Küvetten verteilt. Die aerobe Probe wurde direkt im Spektrometer vermessen. Die reduzierte Probe vor Aufnahme des Spektrums für 10 min bei Raumtemperatur mit H₂ begast. Die Graphik ist in der Publikation Buhrke *et al.* (2004) veröffentlicht.

3.2.1 Versuche zur Isolierung und Identifizierung eines NAD⁺-ähnlichen Kofaktors aus der RH

Als Ausgangsmaterial für Isolierung eines NAD⁺-ähnlichen Kofaktors standen die gereinigte Wildtyp-RH, die als Doppeldimer vorlag und das gereinigte dimere RH_{Stopp}-Protein zur Verfügung. Aus vorangegangenen Experimenten war bekannt, dass die Inkubation der Wildtyp-RH mit einer mit Trypsin kontaminierte DNase in der vollständigen Auflösung des RH-Doppeldimers und der Überführung in die dimere RH-Form resultierte. Aus den spektroskopischen Eigenschaften des RH_{Stopp}-Proteins lässt sich ableiten, dass die C-terminale Verlängerung der HoxB-Untereinheit an der Koordination eines Kofaktors beteiligt ist. Diese Extension ist ein exponiertes Strukturmotiv, dass einen hohen Anteil von Arginin- und Lysin-Resten in seiner Aminosäure-Sequenz aufweist, die Angriffspunkte für Trypsin bilden.

Ziel war es also, den gesamten C-Terminus inklusive des Kofaktors tryptisch zu entfernen. Die RH wurde über die herkömmliche Reinigungsmethode (Tab 7 A) isoliert und einem tryptischen Verdau unterzogen (Abb. 12). Die Versuchsansätze wurden nach unterschiedlichen Inkubationszeiten denaturiert und einer SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung unterzogen. Die Abbildung 12 zeigt deutlich, dass die Gabe von Trypsin zur RH zu einer Leiter an Proteinbanden führt, wobei die HoxB-Bande verschwindet.

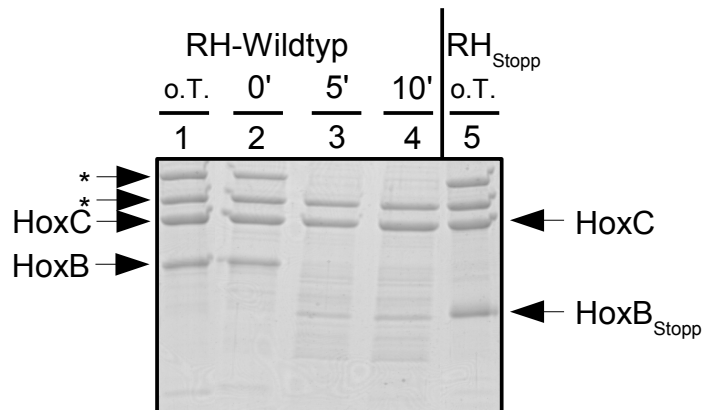


Abb. 12: Tryptische Behandlung der RH. Gereinigte RH (10 µg Protein) des RH-überproduzierenden Stammes HF371(pGE378) wurde mit 0.05 µg Trypsin versehen und 0 bis 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und in einem 10 %igen SDS-Gel aufgetrennt. Die Proteine wurden durch eine Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Als Kontrolle wurde das gereinigte RH_{Stopp}-Protein aufgetragen. o.T. - Proben wurden nicht mit Trypsin behandelt, * - Kontaminationen

Der Zusatz geringer Mengen Trypsins zur gereinigten RH führte schon nach sehr kurzer Inkubationszeit zu einem proteolytischen Abbau der kleinen Untereinheit HoxB. Als Kontrolle diente das auf das Gel aufgetragene gereinigte RH_{Stopp}-Protein. Die Proteinbanden für die proteolytisch verkürzte kleine Untereinheit der RH und für das um die C-terminale Extension verkürzte HoxB des RH_{Stopp}-Proteins laufen im SDS-Gel auf der gleichen Höhe (Spuren 2 und 4), was auf die tryptische Abspaltung des exponierten Strukturmotivs der kleinen Untereinheit HoxB hindeutet. Die mit Trypsin behandelte RH-Probe wurde einer fluorimetrischen Analyse unterzogen, um mit dieser Methode Hinweise über einen organischen Elektronen-Akzeptor zu gewinnen. Eine Fluoreszenz konnte nicht nachgewiesen werden.

Alternativ wurde versucht, einen möglichen Kofaktor über Massenspektrometrie zu identifizieren. Dazu wurde das gereinigte und mit H₂ begaste RH-*Strep*-tag-Protein (1.1 mg) einer Hitzefällung unterzogen, in der Hoffnung, den reduzierten Kofaktor freizusetzen, der sich über seine Absorptionsmaxima spektrometrisch nachweisen ließ. Die Proteinreste wurden durch Zentrifugation abgetrennt. Der Überstand wurde dann

zur weiteren Anreicherung des Kofaktors auf eine C18-Sephasil-Säule aufgetragen. Die Abbildung 13 zeigt das Elutionsprofil eines HPLC-Laufs, wobei die Absorption bei einer Wellenlänge von $\lambda=260$ nm verfolgt wurde. Der prominente Peak zeigt die Elution des möglichen Kofaktors.

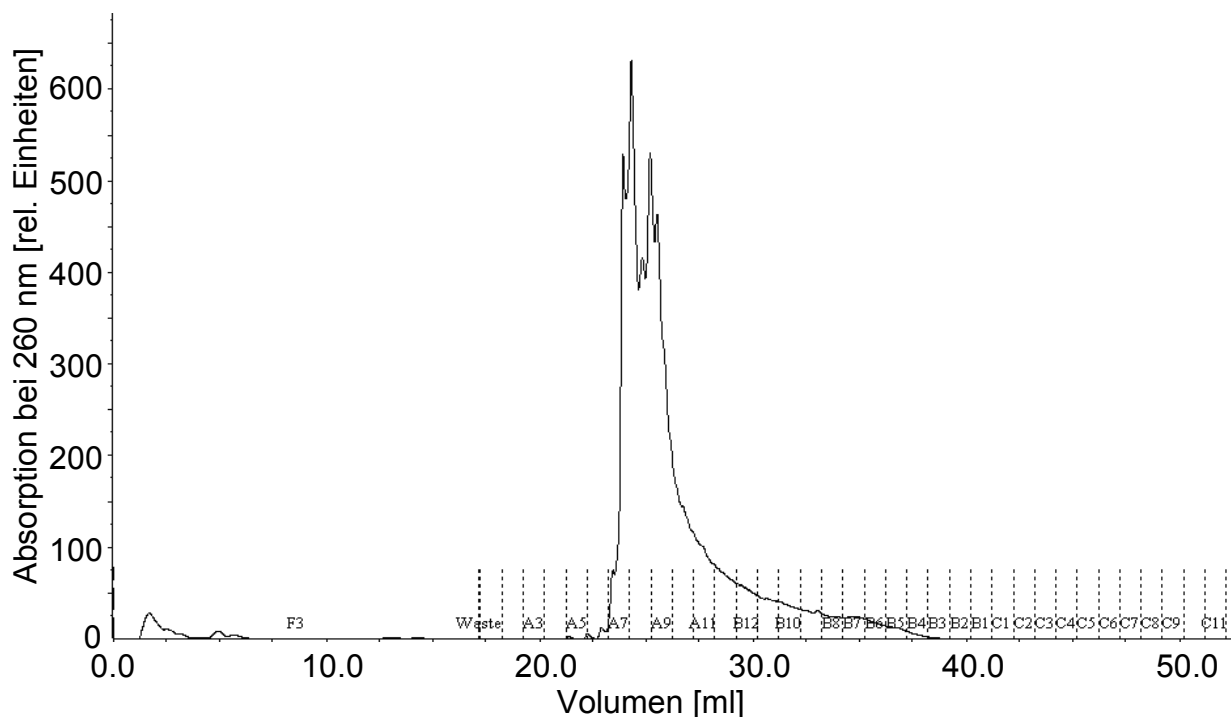


Abb. 13: Elutionsprofil einer „reversed phase“-Chromatographie. Die Kurve gibt die photometrische Messung des Eluats bei 260 nm in relativen Einheiten an. Gestrichelte Linien markieren alle gesammelten Fraktionen.

Alle Fraktionen mit einem Absorptionsmaximum bei 260 nm wurden gesammelt und zur weiteren Identifizierung einer Massenspektrometrie unterzogen. Die Abbildungen 14 A und B zeigen zwei der Massenspektren.

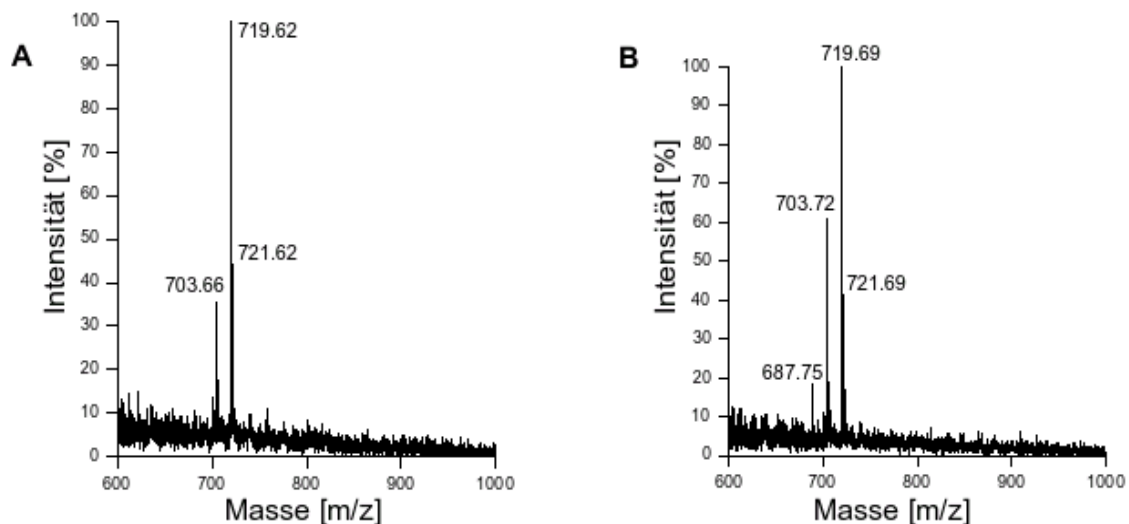


Abb. 14: Massenspektren ausgewählter Fraktionen nach „reversed phase“-Chromatographie. (A) MS-Spektrum von Fraktionen mit einem Absorptionsmaximum bei 260 nm. (B) MS-Spektrum gleicher Fraktionen nach Säulenleerlauf.

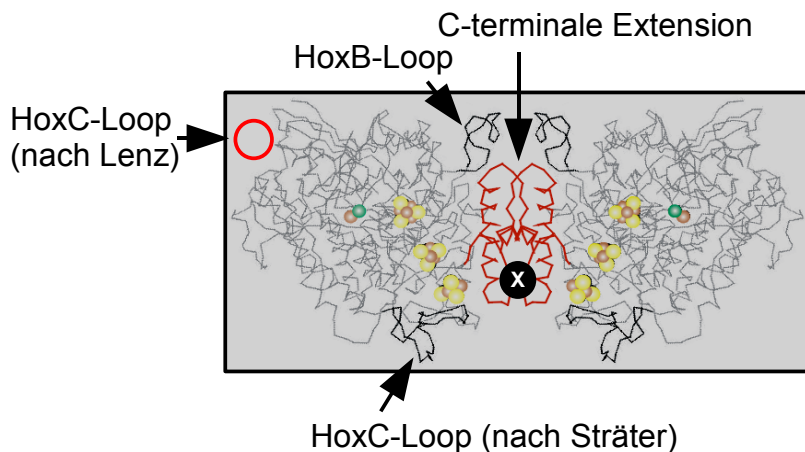
Die Untersuchung der kofaktorhaltigen Fraktionen nach der „reversed phase“-Chromatographie zeigte ein Maximum bei einer Masse von 703.7 m/z und ein zweites bei 719.7 m/z (Abb. 14 A). Zur Prüfung, inwieweit diese Intensitätsmaxima dem Kofaktor zuzuschreiben waren, wurde ein Säulenleerlauf durchgeführt. Die Fraktionen 8 bis 10, die nur Puffer enthielten, wurden ebenfalls einer Massenspektroskopie unterzogen (Abb. 14 B). Diese Proben wiesen auch die beiden Intensitätsmaxima auf, was darauf hindeutet, dass entweder Substanzen aus der HPLC-Anlage, der Säule oder den Puffersubstanzen für die beiden Peaks verantwortlich waren, nicht aber der vermutete Kofaktor.

An dieser Stelle wurde die analytische Arbeit zur Identifizierung des Kofaktors unterbrochen und Funktionsstudien der RH mit Hilfe von Mutantenanalysen angestellt.

3.3 Strukturelle Besonderheiten des H₂-Sensors

3.3.1 Modellierung der Tertiärstruktur und ihre funktionelle Bedeutung

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt stehen noch keine Kristallstrukturen von H₂-Sensoren, die eine Untergruppe der [NiFe]-Hydrogenasen bilden, zur Verfügung. Das aktive Zentrum der H₂-Sensoren entspricht dem der Standard-[NiFe]-Hydrogenasen. Unterschiede treten bei den biochemischen Eigenschaften auf. Die RH von *R. eutropha* ist z.B. insensitiv gegenüber CO und O₂ und ihre H₂-oxidierende Aktivität beträgt nur etwa ein Zehntel von der energieliefernden [NiFe]-Hydrogenasen (Bernhard *et al.* 2001).

A**B****I Loop in HoxC (nach Lenz)**

R. eut. **HoxC** 244-QMGPGPGTYLSYGAYPQPEGGFCFA-268
 A. hyd. **HoxC** 244-SMGPGPGLYMSNGAYPLSERGFRFA-268
 R. cap. **HupV** 242-RLGRGAGRYLSFGAYPLAEG-HGFA-265
 B. jap. **HupV** 242-GLGRGTGLMMSYGAYHGVDG-ELFP-265
 * * * * *

II Loop in HoxB

R. eut. **HoxB** 156-PGGLLGLNYRSRAG-168
 A. hyd. **HoxB** 153-VGGLLGADYRSRSG-165
 R. cap. **HupU** 140-PGGVLAAEFRRARG-152
 B. jap. **HupU** 147-SGGALGAGFRSRLG-159
 * * * * *

III C-Terminus von HoxB

R. eut. **HoxB** 293-PKVAGIPIGLPTDMPKAWFVALASLSKSATPKRVKLNATADHPLIAPAIKTRLK-347
 A. hyd. **HoxB** 290-PKIAGIPIGLPTDMPKAWFVALASLSKSATPKRVQRNATADHRVVVPAIRKTRLK-344
 R. cap. **HupU** 277-PKVAGIPVGLPADMPKAWFMALASLSKAATPERIAKNAVAPRLTVPTIRKPGGRR-332
 B. jap. **HupU** 283-AKLAGIPVGLPTDMPKAWFVALAALSATSATPRRVRLNATADHVVVPPGRSTAKGKP-338
 * * * * * * * * * * * * * * * * *

Abb. 15: Strukturmodell der regulatorischen [NiFe]-Hydrogenase aus *R. eutropha* erstellt auf der Grundlage der Kristallstruktur der [NiFe]-Hydrogenase von *D. gigas*. (nach N. Sträter, Leipzig). (A) Grau dargestellt ist das Proteingerüst der großen und der kleinen Hydrogenase-Untereinheit. Orange-gelb hervorgehoben sind die FeS-Zentren, orange steht für Fe und grün für Ni im aktiven Zentrum. Schwarz dargestellt sind besondere Schleifenstrukturen, rot kennzeichnet die C-terminale Extension von HoxB, der rote Kreis symbolisiert den von O. Lenz vorgeschlagenen Loop in HoxC. (B) Sequenzvergleich der besonderen Strukturen in den Hydrogenase-Untereinheiten HoxBC von *R. eutropha* (R.e. HoxBC; Zugangsnummern der SwissProt-Datenbank: P95603 und P95604) mit homologen Sequenzen der H₂-Sensoren aus *A. hydrogenophilus* (A.h. HoxBC; P94154 und P94155), *R. capsulatus* (R.c. HupUV; Q52695 und O86457) und *B. japonicum* HupUV; Q45254 und Q45255). Hoch konservierte Aminosäuren sind durch Sterne gekennzeichnet.

Die computergestützte Modellierung einer RH-Struktur auf der Basis der Kristallstruktur von *Desulfovibrio gigas* (N. Sträter, Leipzig), zeigte das Vorhandensein dreier schleifenartiger Strukturen, die in dieser Form in den Standard-[NiFe]-Hydrogenasen nicht vorkommen. Alle drei Strukturen liegen auf einer Seite des RH-Dimers (Abb. 15 A).

Ein erneuter Vergleich der Aminosäuresequenzen zwischen den H₂-Sensoren und den Standard-[NiFe]-Hydrogenasen wies auf eine veränderte Position der möglichen schleifenartigen Struktur in der großen Untereinheit HoxC hin (O. Lenz, persönliche Mitteilung). Die Sequenzen der sensorspezifischen Strukturen sind in der Abbildung 15 B dargestellt. Auf das Strukturmodell der RH übertragen, würde die Schleife in der großen Untereinheit HoxC nicht mit der C-terminalen Extension und der Schleifenstruktur in der kleinen Untereinheit HoxB gemeinsam auf einer Seite liegen, sondern auf der entgegengesetzten Seite an der Proteinoberfläche (Abb. 15 A).

Die besonderen Strukturmerkmale der regulatorischen Hydrogenase sind von großem Interesse bei der Suche nach einer Antwort auf die Frage der H₂-sensierenden Funktion. Die gezielte Deletion dieser drei Schleifen sollte zur Identifizierung der RH-Region führen, die (i) an der Bindung eines möglichen Redox-Kofaktors beteiligt ist, (ii) die essentiell für die Oligomerisierung der RH zum (HoxBC)₂-Konformer ist, und (iii) die mit der Histidin-Proteinkinase HoxJ interagiert.

3.3.2 Deletion der Schleifen in den Untereinheiten HoxC und HoxB

Um die Bedeutung der zusätzlichen schleifenartigen Motive in HoxC und HoxB näher zu untersuchen, wurden drei Konstrukte erzeugt, bei denen Leserastererhaltende Deletionen in jeden der offenen Leserahmen eingefügt wurden. Die Konstruktion der Deletionen ist im Kapitel 2.14.2 genauer beschrieben. Zur Expression der RH-Gene wurden die pGE377-Derivate pGE546 (*hoxC*[ΔQ244-A268]), pGE545 (*hoxB*[ΔQ155-L162]) und pGE544 (*hoxB*[ΔQ155-S166]) konjugativ von *E. coli* nach *R. eutropha* HF574 übertragen. Dieser *R. eutropha*-Stamm trägt Deletionen in den Strukturgenen der SH, der MBH sowie der RH und wurde als Rezipient ausgewählt, um unerwünschte Überlagerungen der Hydrogenase-Aktivitäten des Wirts mit den Aktivitäten der Plasmid-kodierten RH-Mutantenproteine zu vermeiden. Die Transkonjuganten wurden unter Hydrogenase-dereprimierenden Bedingungen in FGN-Medium angezogen. In den aus den Zellen gewonnenen löslichen Extrakten wurde die H₂-oxidierende Aktivität amperometrisch gemessen. Wie der Tabelle 8 zu entnehmen ist, wirken sich die Deletionen der Schleifen in HoxC und HoxB sehr drastisch auf die katalytische Aktivität der drei RH-Mutantenproteine aus. Die fehlende H₂-oxidierende Aktivität geht einher mit dem Fehlen der H₂-sensierenden Aktivität dieser Mutantenproteine. Die löslichen Extrakte wurden im SDS-Gel aufgetrennt. In einem anschließenden Immunoblot wurde kontrolliert, ob die Untereinheiten HoxC und HoxB stabil in *R. eutropha* gebildet werden (Abb. 16).

Tab. 8: Hydrogenase-Aktivitäten in Deletionsmutanten von *R. eutropha*

Stamm	Relevante Eigenschaften	H ₂ -oxidierende Aktivität [%] ^(a)	H ₂ -Sensierung ^(b)
HF574(pGE377)	RH-Wildtyp	100	+
HF574(pEDY309)	RH ⁻	<1	-
HF574(pGE546)	HoxC[ΔQ244-A268]	<1	-
HF574(pGE544)	HoxB[ΔQ155-L162]	<1	-
HF574(pGE545)	HoxB[ΔQ155-S166]	<1	-

^(a) Aktivitäten sind in Prozent angegeben. 100 % entspricht folgendem Wert: H₂-oxidierende Aktivität, 0.036 U/mg Protein. Die H₂-oxidierende Aktivität wurde amperometrisch mit Methylenblau als Elektronenakzeptor gemessen.

^(b) gemessen als β-Galaktosidase-Aktivität in heterotroph gewachsenen Zellen (FGN bis OD_{436 nm} = 8.0 ± 0.3) mit H₂

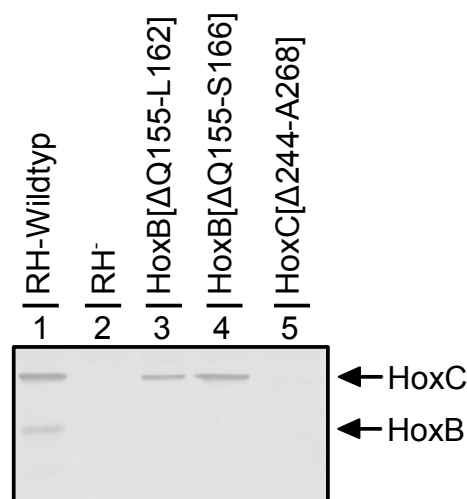


Abb. 16: Analyse der RH-Mutantenproteine im Immunoblot. Lösliche Extrakte von FGN-gezogenen Zellen der Transkonjuganten wurden im 12 %igen SDS-Gel aufgetrennt und gebロットet. Der Nachweis der Untereinheiten erfolgte mit einem Antikörper gegen HoxBC. Pro Spur wurden 20 µg Protein aufgetragen. Die Pfeile markieren die große und die kleine Hydrogenase-Untereinheit. *Spuren:* 1 HF574(pGE377), 2 HF574(pEDY309), 3 HF574(pGE544), 4 HF574(pGE545), 5 HF574(pGE546)

Für die RH-Mutanten HoxB[ΔQ155-L162] und HoxB[ΔQ155-S166] konnte nur die HoxC-Untereinheit identifiziert werden (Abb. 16, Spuren 3 und 4). Die kleine Untereinheit erwies sich durch die Deletionen als instabil, so dass sie in den Mutantenzellen wahrscheinlich schnell proteolytisch abgebaut wird. Für das RH-Mutantenprotein HoxC[ΔQ244-A268] konnten weder die große Untereinheit HoxC noch die kleine Untereinheit HoxB immunologisch nachgewiesen werden (Spur 5). Offensichtlich wurde HoxC durch die Deletion der 24 Aminosäuren umfassenden Strukturschleife ebenfalls so instabil, dass auch diese Untereinheit proteolytisch degradiert wird. Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass eine Instabilität von

HoxC einen Abbau von HoxB mit sich führt (T. Buhrke, persönliche Mitteilung). Aussagen über die Funktion der Schleifen in HoxB und HoxC ließen sich auf Grund der Instabilität der Mutantenproteine und der fehlenden H_2 -oxidierenden und H_2 -sensierenden Aktivitäten nicht treffen.

3.3.3 Identifizierung verschiedener RH-Konformationen

Als ein besonderes Strukturmerkmal des H_2 -Sensors gilt die C-terminale Extension der kleinen Untereinheit. In früheren Arbeiten wurde diese C-terminale Extension durch den Austausch des Prolins an der Position 293 in HoxB gegen ein Stopp-Codon entfernt (Buhrke *et al.* 2004). Das resultierende RH-Mutantenprotein (RH_{Stopp}) war in seiner H_2 -oxidierende Aktivität, verglichen mit der Aktivität der Wildtyp-RH, nicht eingeschränkt. Gleiches ließ sich für die D_2/H^+ -Austauschaktivität feststellen.

Ein großer Unterschied zwischen der Wildtyp-RH und dem RH_{Stopp}-Protein konnte nach der Auftrennung von löslichen Extrakten in einer nativen PAGE und anschließendem Immunoblot beobachtet werden. Mit Hilfe des anti-HoxB Antikörpers waren zwei verschiedene Formen der RH detektierbar. Während die Wildtyp-RH auf der Höhe des HoxBC-Doppeldimers ein immunologisches Signal zeigte, war das RH_{Stopp}-Protein immunologisch auf der Höhe des HoxBC-Dimers nachzuweisen. Dieser Befund deutet auf die Notwendigkeit der C-terminalen Extension von HoxB für die Ausbildung der HoxBC-Doppeldimers hin (Buhrke 2002). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass das RH_{Stopp}-Protein seine Fähigkeit zur H_2 -Sensierung und zur Komplexbildung mit der Histidin-Proteinkinase HoxJ verloren hatte (Buhrke *et al.* 2004).

Neben dem amperometrischen Enzymtest zur quantitativen Bestimmung der H_2 -oxidierenden Aktivität von unterschiedlichen RH-Formen, ist es auch möglich, qualitativ das Vorhandensein von H_2 -oxidierender Aktivität der RH im Aktivitätsgel zu testen. Nach der Auftrennung der Proteine in einer nativen PAGE kann die enzymatische Aktivität der RH als H_2 -abhängige Reduktion von Phenazinmethosulfat (PMS) und p-Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) und der daraus resultierenden Violettfärbung der Proteinbanden demonstriert werden. Diese Methode ermöglicht zum einen den Nachweis von sehr niedrigen H_2 -oxidierenden Aktivitäten. Zum anderen lassen sich mit diesem Test unterschiedliche Konformationen katalytisch aktiver RH detektieren.

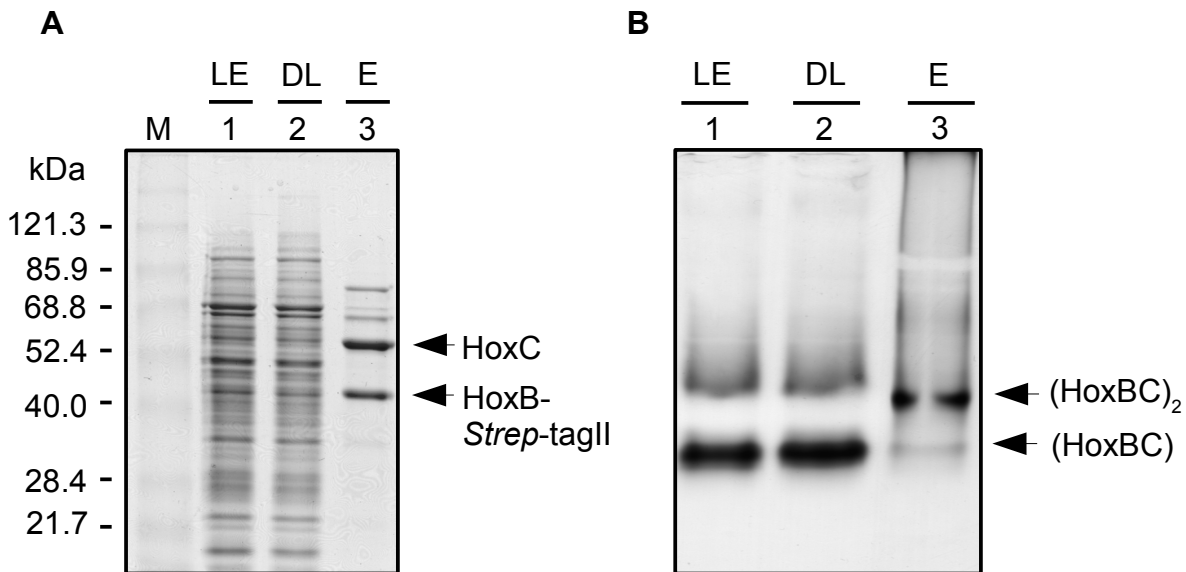


Abb. 17: Identifizierung von RH-Konformeren. (A) SDS-PAGE und nachfolgende Coomassie-Färbung. (B) native PAGE und anschließende Aktivitätsfärbung im Gel. Die Zellen wurden heterotroph in FGN kultiviert und daraus löslicher Extrakt hergestellt. Aliquots der einzelnen Reinigungsschritte wurde in einem 12 %igen SDS-Gel aufgetrennt. *Spuren*: 1 löslicher Extrakt von *R. eutropha* HF574(pGE513) (20 µg), 2 Säulendurchlauf (20 µg), 3 vereinigte Fraktionen nach *Strep*-Tactin-Superflow Säule (5 µg), *M* Proteinstandard

In der Abbildung 17 A ist der Verlauf einer RH-*Strep*-tag-Reinigung gezeigt. Nach dem letzten Reinigungsschritt waren zwei prominente Proteinbanden im Gel sichtbar, die den Untereinheiten HoxB mit 36 kDa und HoxC mit 52 kDa entsprachen (Abb. 17 A, Spur 3). Die Abbildung 17 B zeigt ein Gel, in dem die Proteine nach den einzelnen Reinigungsschritten unter nativen Bedingungen aufgetrennt wurden. Durch die anschließende Aktivitätsfärbung ließen sich zwei unterschiedliche RH-korrespondierende Aktivitätsbanden im löslichen Extrakt und im Säulendurchlauf nachweisen (Spuren 1 und 2). Die elektrophoretisch schneller laufende Bande konnte durch die Reinigung mit einer *Strep*-Tactin-Superflow-Affinitätschromatographie abgetrennt werden (Spur 3). Im Verlauf der Reinigung wurde die langsamer wandernde Form der RH isoliert, die dem HoxBC-Doppeldimer entsprach. Nur diese doppeldimere RH ist in der Lage, mit der Histidin-Proteinkinase HoxJ einen Komplex einzugehen und ist favorisiert für die Identifizierung eines zusätzlichen Redox-Kofaktors.

3.4 Das aktive Zentrum der RH

3.4.1 Röntgenabsorptionsspektroskopie am [NiFe]-Zentrum der RH

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt stehen von den O₂-toleranten [NiFe]-Hydrogenasen noch keine Kristalle zur Verfügung, an Hand derer sich die Struktur und Funktionsmodelle der Proteine ableiten ließen. Die Röntgenabsorptionsspektroskopie (XAS) ermöglicht es, sich die Umgebung des [NiFe]-Zentrums der RH genauer anzuschauen und Rückschlüsse auf die Ligandierung und die Struktur des aktiven Zentrums in verschiedenen Redox-Stadien der RH zu ziehen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die RH auf herkömmliche Art gereinigt (siehe Kapitel 2.7) und für XAS-Analysen zur Verfügung gestellt (Messung durch M. Haumann und Mitarbeiter, Berlin). „X-ray near-edge structure“ (XANES)-Spektren an der Ni-Kante wurden mit der RH im oxidierten (RH^{ox}) und im reduzierten (RH^{red}) Zustand aufgenommen.

Beim Betrachten der unterschiedlichen Spektren in der Abbildung 18 wird deutlich, dass das Begasen der RH für 10 min mit H₂ zu einer drastischen Veränderung an der Ni-Kante führte. Der Kurvenverlauf für die oxidierte RH war relativ breit und wies eine Schulter bei ~8337 eV auf (Abb. 18 a). Die Energie der Ni-Kante beträgt 8339.8 eV. Das Spektrum der reduzierten RH (Abb. 18 b) war gekennzeichnet durch ein scharfes Maximum bei ~8350 eV, welches in der oxidierten Probe fehlte. Die Energie der Ni-Kante hatte sich um 1.3 eV nach 8341.1 eV verschoben. Ein Verschieben in Richtung höherer Energie von ~8330.5 eV nach ~8331.5 eV fand auch im so genannten „Vor-Peak“ statt (Abb 18, kleiner Bildausschnitt). Eine Verlängerung der Begasungsdauer von 10 auf 25 min hatte keinen weiteren Einfluss auf den Verlauf der XANES-Spektren. Ein Verkürzen der Inkubationszeit auf drei Minuten führte zu einem Spektrum, dessen Graph zwischen dem der oxidierten und dem der reduzierten RH lag (Abb. 18 e).

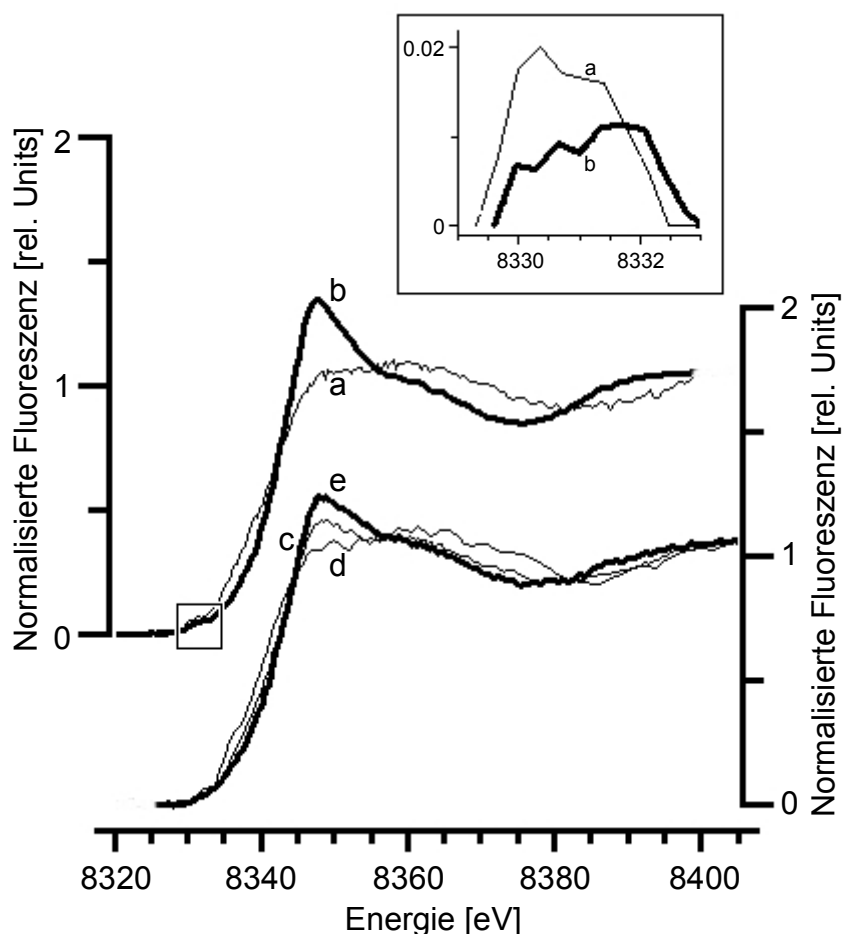


Abb. 18: XANES-Spektren der RH. *a* RH im oxidierten Zustand (dünne Linie), *b* RH, reduziert durch 10 minütiges Begasen mit H_2 (dicke Linie), *c* RH „as isolated“, unvollständig an der Luft oxidiert (mittlere Linie), *d* RH, unvollständig an der Luft oxidiert + 0.5 mM DTT (dünne Linie), *e* RH, drei Minuten begast mit H_2 . Der vergrößerte Bildausschnitt zeigt die Vorpeaks der oxidierten RH (*a*) und der reduzierten RH (*b*) nach Abzug des Kantenuntergrunds (Abb. verändert nach Haumann *et al.* 2003).

Die Energie, die die Position der Ni-Kante beschreibt, ist für das Erkennen des Oxidationszustands wichtig. Häufig ist ein Anstieg der Kantenenergie mit der Oxidation eines Metalls verbunden. Der Energiesprung von 1.3 eV während der Reduktion der RH bedeutet möglicherweise (i) die Gegenwart einer gemischten (O, N), S-Koordination des Ni in der RH, (ii) ein erhöhtes Verhältnis von (O, N) zu S in der reduzierten RH oder (iii) eine Änderung des Oxidationszustands von Ni(II) zu Ni(III) in der reduzierten RH. Der Oxidationsstatus wurde parallel mittels EPR-Spektroskopie untersucht. Während in Standard-[NiFe]-Hydrogenasen eine Vielzahl von Redox-Zuständen für das aktive Zentrum identifiziert wurden (Albracht 1994, Higuchi *et al.* 1999, Cammack *et al.* 2001, Stein & Lubitz 2002, Schwartz & Friedrich 2003, Stein & Lubitz 2004, Volbeda *et al.* 2005), sind für die RH nur die beiden Zustände Ni-C und Ni-L gefunden worden (Pierik *et al.* 1998b, Bernhard *et al.* 2001, Haumann *et al.* 2003). Für die oxidierte RH

konnte in dieser Arbeit kein EPR-Signal detektiert werden. Die reduzierte RH lieferte dagegen ein typisches Ni-C-Signal mit den g-Faktoren (auch Landé-Faktoren) 2.19, 2.14 und 2.01 (Tab. 13). Die XANES-Daten und das Ni-C-Signal stärken die Annahme, dass in der reduzierten RH Nickel in Form von Ni(III) vorliegt.

Der Verlauf, die Schärfe und die Breite der Ni-Kante sind abhängig von der Ligandenumgebung des Nickels. Eine scharfe Kante mit einem hohen Maximum, wie z.B. in der RH^{red} , deutet auf eine von (O, N)-Liganden dominierte Umgebung des Ni hin. Eine rundere Kante, wie sie im Fall der RH^{ox} beschrieben wurde, weist auf Schwefel-Liganden hin. Vermutlich rühren die Veränderungen im Verlauf der Ni-Kante der reduzierten RH nicht allein von einer Änderung des Redox-Zustands des Ni. Eher ist zu vermuten, dass es zusätzlich zu einer Änderung der Ni-Koordinierung kommt. Der Verlauf der Ni-Kante in der RH^{red} deutet auf die Präsenz von sechsfach koordiniertem Ni mit zwei S-Liganden hin. Der „Vor-Peak“ an der Ni-Kante war größer als der, der meistens bei symmetrischen vier- oder sechsfach koordiniertem Ni gefunden wurde. Das könnte ein Hinweis auf fünffach koordiniertes Ni in der RH^{ox} sein. Ein weiteres Indiz dafür stellt die Schulter bei ~8337 eV im aufsteigenden Abschnitt der Ni-Kante dar. Diese Schulter wird den energetisch niedrigen $1s \rightarrow 4p_z$ Übergängen zugeschrieben, die bei einer Verzerrung der idealen oktaedrischen Struktur beobachtet wurden (Eidness *et al.* 1988, Colpas *et al.* 1991, Musgrave *et al.* 2002, Dau *et al.* 2003).

Die Abbildung 19 zeigt die Fourier-transformierten „extended X-ray absorption fine structure“ (EXAFS)-Spektren der RH^{ox} (Abb. 19 a) und der RH^{red} (Abb. 19 b). Die Frequenz der EXAFS-Oszillation ist abhängig vom Abstand des absorbierenden Atoms und des reflektierenden zurückgeworfenen Atoms. Die Frequenzanalyse der EXAFS-Spektren erlaubt daher Rückschlüsse über den Abstand zwischen dem Metallatom und seinen Liganden.

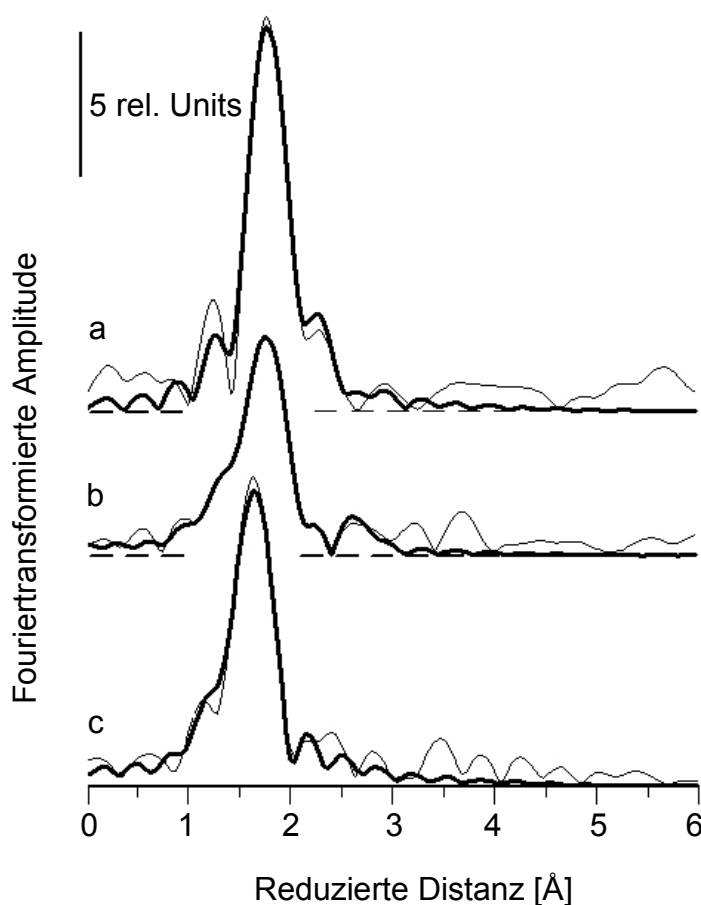


Abb. 19: Fouriertransformierte „extended X-ray absorption fine structure“ (EXAFS)-Spektren der RH. *a* oxidierte RH, *b* RH für 10 min mit H₂ begast, *c* Ni(H₂O)₆ einer 5 mM NiCl₂-Lösung. Dünne Linien zeigen die experimentellen Daten, dicke Linien geben die Ergebnisse von Simulationen wieder (nach Haumann *et al.* 2003).

Die Kurve der reduzierten RH zeigte einen deutlichen Abfall der fouriertransformierten Amplitude des Hauptpeaks. Beide Spektren besaßen ein Maximum bei 1.8 Å reduzierter Distanz. Das Spektrum von Ni(H₂O)₆ wies einen maximalen Peak in einer weniger reduzierten Distanz auf (Abb. 19 c). Ein Vergleich der Spektren deutet auf eine unterschiedliche Ligandierung des Ni in der RH hin. Auf das Modell des aktiven Zentrums der Standard-[NiFe]-Hydrogenasen übertragen (Abb. 3 B), bedeutet dies, dass sich die Anzahl der S-Liganden am Nickel in der RH^{red} gegenüber der oxidierten RH verringert und statt eines S-Liganden ein (O,N)- oder H-Ligand gebunden wird. In der RH^{ox} liegt Nickel demnach fünffach koordiniert vor, als Ni^{II}(O,N)₂S₃ und in der reduzierten RH als sechsfach koordiniertes Ni^{III}(O,N)₃XS₂, wobei X ein (O,N)- oder H-Ligand sein kann (Haumann *et al.* 2003).

3.4.2 Spektroskopische Analysen am RH_{Stopp}-Protein

Bislang war es unmöglich, die um die C-terminale Extension verkürzte Version der RH (RH_{Stopp}) zu reinigen. Spektroskopische Analysen mit diesem Protein ließen sich nur an löslichem Extrakt durchführen. Erst die *Strep*-tag basierte Reinigungsmethode, die in dieser Arbeit entwickelt und optimiert wurde, ermöglichte es, neben der Wildtyp-RH auch die RH_{Stopp} zu isolieren.

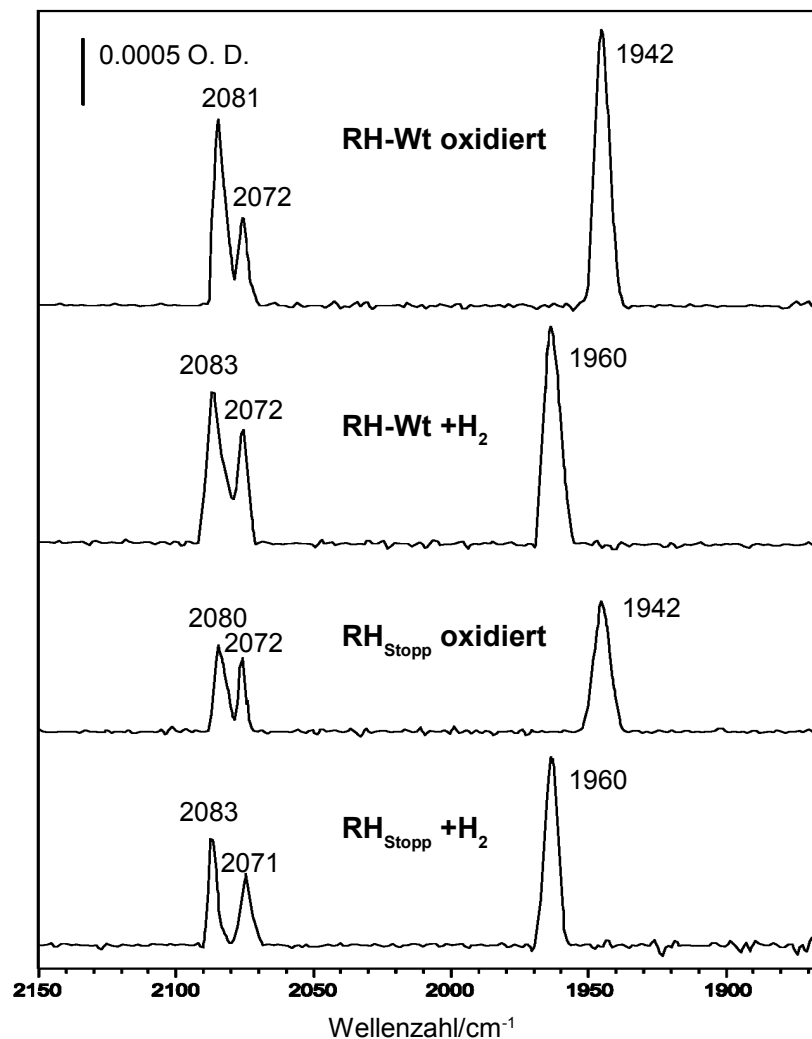


Abb. 20: FTIR-Analyse von Wildtyp-RH und RH_{Stopp}-Protein. Die Aufnahme der FTIR-Spektren von gereinigten *Strep*-tag-RH-Proteinen erfolgte wie in Pierik et al. (1998b) beschrieben. Die Reduktion der RH-Proteine erfolgte durch Begasen mit H₂. Die Proteinkonzentration der Wildtyp-RH betrug 22.5 mg/ml, die der RH_{Stopp} 5.2 mg/ml. Die Messungen erfolgten bei Raumtemperatur. Die Basislinie wurde durch Subtraktion eines Referenzspektrums von Wasser korrigiert.

An beiden Isolaten wurden Fourier-Transformations-Infrarot (FTIR)- und EPR-spektroskopische Analysen durchgeführt (Messung durch S. Albracht und Mitarbeiter, Amsterdam), um zu untersuchen, ob die Zusammensetzung des aktiven Zentrums in beiden Proteinen identisch ist und ob sich nach dem Entfernen der C-terminalen

Extension von HoxB die FeS-Zentren reduzieren lassen. Die Ergebnisse der FTIR-Messungen sind in der Abbildung 20 dargestellt. Das Spektrum der oxidierten RH_{Stopp} ist identisch mit dem der Wildtyp-RH, die ein starkes Maximum bei 1942 cm⁻¹ und zwei weitere kleinere Maxima bei 2072 cm⁻¹ und 2081 cm⁻¹ zeigen, verursacht durch die diatomaren Liganden CO und CN⁻ am Eisenatom. Durch die Reduktion der Proteine mit H₂ kam es zu einer Verschiebung des Signals für den CO-Liganden um 18.5 cm⁻¹ hin zu einer höheren Wellenzahl. Die Maxima in der CN⁻-Region verschoben sich nicht (Abb. 20). Dieses Resultat ist für die Wildtyp-RH schon bekannt (Bernhard *et al.* 2001). Auch die EPR-Spektren von der RH_{Stopp} und der Wildtyp-RH weisen keine Unterschiede auf. Das 10 minütige Begasen der RH mit H₂ führte zur Bildung des Ni-C Zustands im [NiFe]-Zentrum.

Die EPR- und FTIR-spektroskopischen Daten deuten darauf hin, dass das Entfernen der C-terminalen Extension der RH keinen Einfluss auf die katalytischen Eigenschaften der RH_{Stopp} hat. Im Gegensatz zum HoxBC-Doppeldimer ist das RH_{Stopp}-Protein stabiler und lässt sich mit Hilfe der *Strep*-tag-Technik mit wesentlich höheren Ausbeuten reinigen (Tab. 9). Damit lassen sich zukünftig große Mengen RH_{Stopp}-Proteins bereitstellen, die für XAS-Untersuchungen benötigt werden.

Tab. 9: *Strep*-tag-II-Reinigung der RH_{Stopp}

Reinigungsschritt	Gesamt-protein [mg]	Gesamt-aktivität [U]	Spezifische Aktivität ^(a) [U/mg]	Ausbeute [%]	Anreicherungs-faktor
Löslicher Extrakt	1916.7	14.9	0.008	100	-
Streptactin-Superflow	9.6	10.2	1.070	68	134

^(a) Die H₂-oxidierende Aktivität wurde amperometrisch mit Methylenblau als Elektronenakzeptor gemessen.

Aus ca. 30 g Zellen ließ sich mit Hilfe der *Strep*-tag-Reinigungsmethode ca. 10 mg RH_{Stopp}-Protein reinigen. Reduzierte Proben wurden für 10 min mit H₂ begast, bevor sie in Probenröhrchen gefüllt und in flüssigem Stickstoff eingefroren wurden.

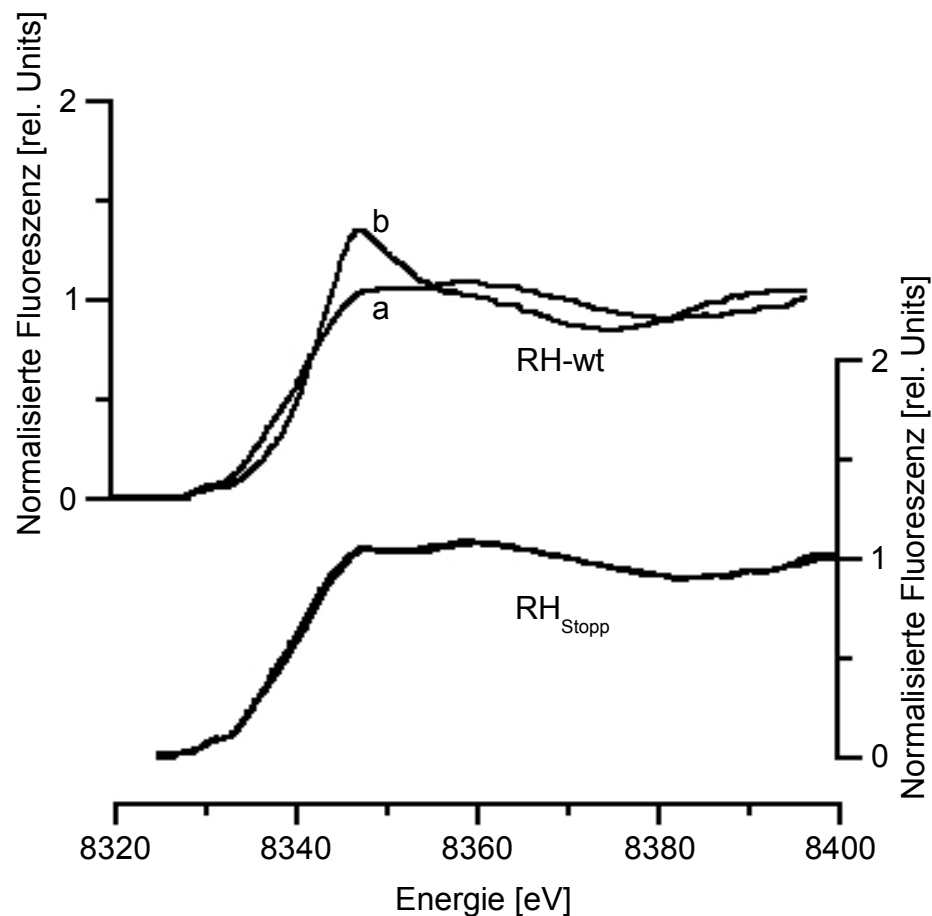


Abb. 21: XANES-Spektren der Wildtyp-RH und der RH_{Stopp} . *a* Wildtyp-RH im oxidierten Zustand, *b* Wildtyp-RH nach Reduktion mit H_2 .

In der Abbildung 21 sind XANES-Spektren der RH_{Stopp} und der Wildtyp-RH dargestellt. Für das HoxBC-Doppeldimer wurde die schon in der Abbildung 18 dargestellte abgerundetere Ni-Kante im oxidierten Zustand detektiert, was darauf hindeutet, dass Nickel fünffach koordiniert als $Ni^{II}(O,N)_2S_3$ im aktiven Zentrum vorliegt. Die reduzierte RH zeigte eine scharfe Kante mit einem großen Maximum. Das deutet auf sechsfach koordiniertes $Ni^{III}(O,N)_3XS_2$ hin, wobei X ein (O,N)- oder H-Ligand sein kann.

Der Verlauf der XANES-Spektren an der Ni-Kante, gemessen an oxidiert und reduzierter RH_{Stopp} , wies keinen Unterschied auf. Beide Spektren sind dem der oxidierten Wildtyp-RH sehr ähnlich, welches sich durch eine breite Ni-Kante und eine nicht aufgelöste Schulter bei ~ 8337 eV auszeichnete. Anders als bei der Wildtyp-RH scheint das Nickel in der RH_{Stopp} sowohl im oxidierten als auch im reduzierten Zustand fünffach koordiniert zu sein.

3.5 Aminosäure-Austausche am [NiFe]-Zentrum der RH

3.5.1 Die konservierten Motive in der katalytischen Untereinheit von [NiFe]-Hydrogenasen

Die regulatorische Hydrogenase und homologe H₂-sensierende Proteine bilden eine Untergruppe der [NiFe]-Hydrogenasen, die sich durch besondere biochemische Eigenschaften auszeichnen. So ist die H₂-oxidierende Aktivität der RH um zwei Größenordnungen geringer als die Aktivität der energieliefernden Hydrogenasen SH und MBH. Weiterhin ist die RH insensitiv gegenüber Sauerstoff und Kohlenmonoxid, und dieses Protein zeigt untypische Kinetiken in der D₂/H⁺-Austauschreaktion. Im Gegensatz zu den Standard-[NiFe]-Hydrogenasen ist die RH nicht in der Lage, HD als Zwischenprodukt der D₂/H⁺-Austauschreaktion zu bilden (Bernhard *et al.* 2001). Spektroskopische Analysen haben gezeigt, dass an das Eisen des [NiFe]-Zentrums drei diatomare Nichtproteinliganden gebunden sind, ein CO und zwei CN⁻ (Pierik *et al.* 1998b, Bernhard *et al.* 2001). Dieser Aufbau des aktiven Zentrums entspricht dem der Standard-[NiFe]-Hydrogenasen (Montet *et al.* 1997, Matias *et al.* 2001, Volbeda *et al.* 2005).

Aus dem Sequenzvergleich verschiedener energieliefernder [NiFe]-Hydrogenasen wurden die fünf Konsensusmotive L1 bis L5 in der großen Untereinheit abgeleitet (Voordouw 1992, Albracht 1994). Die Abbildung 22 zeigt einen Sequenzvergleich der großen Untereinheiten von vier H₂-Sensoren und vier Standard-[NiFe]-Hydrogenasen. Nahe des N-Terminus der großen Untereinheit ist noch ein sechstes, weitgehend konserviertes Motiv identifiziert worden, das so genannte L0-Motiv (Burgdorf *et al.* 2002). Die Konsensussequenzen der Motive L0 bis L5 sind in der Abbildung 22 grau hervorgehoben. Analysen bisher verfügbarer Kristallstrukturen von [NiFe]-Hydrogenasen zeigen, dass die einzelnen Aminosäuren der sechs Motive die unmittelbare Proteinumgebung des aktiven Zentrums bilden (Volbeda *et al.* 1995, Montet *et al.* 1997, Matias *et al.* 2001). Das aktive Zentrum der [NiFe]-Hydrogenasen ist tief eingebettet in eine Bindungstasche, die durch die stark konservierten Aminosäuren der Motive L1 bis L5 gebildet wird. Die Aminosäuren des L0-Motivs liegen an der Kontaktstelle zwischen der großen und der kleinen Untereinheit.

R.e. HoxC	-----MERLVVGFNVRVEGDLEVNLEVAS-GRVCSARVNATMYRGLEQILLHRHPLDALVYAFPRVCGICSVSQ	67
A.h. HoxC	-----MTRLIVGFNVRVEGDLEVDLADIAD-GQVRTAKVNAPMFRGFEQILLGLPMDALVYAFPRICGICSVSQ	67
R.c. HupV	-----MSDTPRLVGFNVRVEGDLEVHLDLAG-GRVAAARVNSFLYRGFERMLEGRAPSDALTLTPRICGICSVSQ	70
B.j. HupV	-----MTRITIGFNFVRVEGDLEVRDLVES-GRVMRAEVTAPLYRGFEQILEGRFPDLALALAPRICGICSVSQ	67
R.e. HoxG	MSAYATQGFNLDGRGRIIVDPVTRIEGHMRCEVNVNANNVIRNAVSTGTMRWGLEVILKGRDPRDAWAFVERICGVCTGTH	82
R.c. HupL	MTTQTPTNGFTLDNAGKRIVDPVTRIEGHMRCEVNVNDDQGIITNAVSTGTMRWGLEVILKGRDPRDAWAFVERICGVCTGTH	82
B.j. HupL	MAVQTPTNGFNLDGRSGKRIVDPLTRIEGHLRIEANLSDNVIRNAVSSGTIWRGIEVILKGRDPRDAWAFVERICGVCTGTH	82
D.g. HydB	MSEMQ-----GNKIVVDPTITRIEGHLRIEVEVEG-GRIKNAWSMTLFRGLEMLKGRDPRDAQHTQRACGVCTYVH	72
Motiv L0: RxEGH		
R.e. HoxC	SVAASRALADLAGVTVFANGMLAMNMLATENLADHLTHFYLFPMDFTREIYAGRPWHTDARFSPFTHG---KHRLAIA	146
A.h. HoxC	SVAAARALEDATGVIAFLNGQLLTNLMLATENLADHLTHFYLFPMDFARAIYASWAWHGTVHERFAAQGG---RHAKLALA	146
R.c. HupV	SAAAAALGAAAGLAPTDQGAWLAALIHAVENVSDHLVHFNLFPMDFTRPCYARFWYPRAVAFPAATG---QAGRAAIA	149
B.j. HupV	SVAAAAALRDAMSIEAAFNGLLATNIAHAENAADHLTHFYIFPMDFAREAYAAHSHWSETRERFAATRG---SAARDALP	146
R.e. HoxG	ALASVRAVENALDIRIPKNAHLIREIMAKTLQVHDHAVHFYHLHALDWDVMSALKADPKRTSELQQLVSPFAHPLSSAGYFR	164
R.c. HupL	ALTSVRAVESALGITIPDNANSIRNMQLNLQIHDIHVHFYHLHALDWDVNVNALRADPKATSELQQQVWSPSPHPLSSPGYFR	164
B.j. HupL	ALTSVRAVENALGITIPENANSIRNIMQLCLLVHDHVLVHFYHLHSLDWDVNVVSAKDDPKSTSTLAQGISP-WPLSSPGYFK	163
D.g. HydB	ALASVRAVDNVCVGVKIPENATLMRNLTMAQYQMHDLVHFYHLHALDWDVNVANALNADPAKAARLANDLSF---RKTTTESLK	152
Motiv L3: HxHxxHxxHLxL		
R.e. HoxC	ARQRWFTLMG-----TLGGKWP-----HTESVQPGGSSR---AIDAAERVRLGRVREFRCFLEQTLYAAP-----LE	206
A.h. HoxC	ARQRWFTLG-----MLGGKWP-----HTSQIQPGGSSR---AVDASERIRLLVKVREFRSFLEQTLYGAP-----LE	206
R.c. HupV	ARGGLMHILG-----LMAGKWP-----HTLALQPGGVTR---TPGPRDILRIQTELRMFRKHLETOVFGGR-----LE	209
B.j. HupV	ARARILETMG-----IIAGKWP-----HSLAQPGGSTR---AIDLGERVRLSITTAFRSFLERVVFPADS-----LE	206
R.e. HoxG	DIONRLKRFVESGQLGPFMNCYWG--SKAYVLPPEANLMAVTHYLEALDLQKEWKIHTIFGCKNPHFNLYVGGVFCAINLD	244
R.c. HupL	DVQNRKKFVESGQLGLFKNGYWD--NPAKYLPPEADMLMATHYLEALDLQKEVVKVHTIFGCKNPHFNWLVGGVFCPINVD	244
B.j. HupL	DLQIRLGKFFGSGQLGPFKNGYWG--HPAYKLPPEANLIAVAHYLEALDLQKEIVKQAIYGGCKNPHFNWLVGGVFCAINLD	243
D.g. HydB	AVQAKVALVESGQLGIFTNAYFLGGHPAYVLPFAEVDLIAVAHYLEALRVQVKAARAMAIFGAKNPFOTFTV-----VG	226
R.e. HoxC	DVVALDS---EVALWRWHAQAPQAGDLRCFLTIAQDAALDQMGF--GPG-----TYLSYGAYPQ-----PEGGFCFAQG	270
A.h. HoxC	EVAALDS---EQALRDWHAGAPDAGDFRLFLSLSWALGLDSMGF--GPG-----LYMSNGAYPL-----SERGFRFAQG	270
R.c. HupV	DFVVLAS---VADLLRWDR---GDAGLFVEIAADLDLRLGR--GAG-----RYLSFGAYPL-----AEG-HGFAFG	267
B.j. HupV	NVLAIAS---ADELDSWRDG---RGGDFAHFLRLADSLALTLGR--GTG-----LMMSYGAYHG---VDG-ELFPFG	267
R.e. HoxG	GIGAAAPVNMERLSFVKARIDEIIEFNKNVYVDPDLAIGTLYKQAGWLYGGGLAATNVLDYGEYFN--VAYNKSTDQPLGG	324
R.c. HupL	GVGAVGA-INMERLNLVSSIIDRCTEFTRNVLPLDLKAIGGFYK--EWLYGGGLSGQSVLSYGDIPENFDFSAQOLHLPRG	323
B.j. HupL	GIGAVGA-IGMERLNIISIIIDRSIEFVEQVYLPDIAAIFSYK--DWLHGGGLSSKSVMSYGDIFEKANDCSGESFKLPRG	322
D.g. HydB	GCTNYDS-LRPERIAEFKLYKEVREFIEQVYITDLLAVAGFYK--NWAGIGKTS--NFLTCGEFFT--DEYDLNSRYTFQG	301
R.e. HoxC	VWRSAGQ---RLDALDLAAISEDATSALVDQGG--ARHPANGLTAP-----APDKVGAYTWNKAPRLA	329
A.h. HoxC	VWDAAG---TVSELDTAASIEDATHAFLAADGR--PRHPAEGVTLP-----EVDKPGAYTWNKAPRLN	329
R.c. HupV	LWQAGA---VTAPDMAAIAEDLSHAWML--GG--THAFPDGVTFRD-----ETMREGAYSWCKAPRLG	323
B.j. HupV	LFQFCAT---IEPLFLTQITEDVSHAWMR--DS--SADPAHSSVTP-----DPPKPAAYSWCKAPRLS	323
R.e. HoxG	AILNGN-WDEVFPVDPDRSQVQEFVSHSWKYADESVGLHPWDGVTEFPNVVLGANTKGTTRTRIEQIDESAKEYSWIKSPWR	405
R.c. HupL	AIINGN-LNEVHDVDTDPPEQVQEFVDHSHWYDYGEPGMGLHPWDGRTEFPKELGPNLKGRTNINENIDEGAKYSWIKAPWR	404
B.j. HupL	VILDGN-LKEILPIDHGDPEQIQEFVAHSHWYKPGHCCGLLPWDGITEPSFELGPKLKGSKTDIKELDEGGKYSWIKAPWR	403
D.g. HydB	VWVG---NDLSKVDDFNPDLIEEHVKYSWYEGAD---AHPYKGVTKP-----KWTEFHGEDRYSWMKAPRYK	363
R.e. HoxC	GAVLETGAIAIAR-----QLAGAQLVLR---DA-----VARCGATVYTRVLARLVELARV	374
A.h. HoxC	GRVLETGAIAIAR-----QMVDGHLVLR---DA-----VARCGGVYTRVLARLLELALI	374
R.c. HupV	GQFVEVGALAR-----QLIDGHPLA-----VDLAGGGVLARVAGRLLELART	365
B.j. HupV	GQPIEVGAIAIAR-----QTVAQALIT---DL-----VARDGTNVRSRVIARLIETARI	368
R.e. HoxG	GHAMEVGPLSRYLAYAHARSNGKYAERPKEQLEYSQAMNSAIFKALGLPETQYTLKQLLPSTIGRTLARALESQYCGEMM	487
R.c. HupL	GNAMEVGPLA-----ATSSVTRKGHEDIKNQVEG---LLK---DMNLFPVS-----ALFSTLGRTAARALEAECYCRRLQ	466
B.j. HupL	GRAVEVGPLAR-----YIIGYAQGAEFKEFAER---LLK---GLNLFPVT-----ALFSTLGRTAARALECQWAAHQM	465
D.g. HydB	GEAFEVGPLAS-----VLVAYAKKHEFTVKAVDL---VLK---TLGVGFE-----ALFSTLGRTAARGIQCLTAAQEV	425
R.e. HoxC	VPLMEDWLQSLEIGAF-----YWASAHLPDQAGVGLTEAARGSLGHWSVVRDGRIDNYQIVAPTSWNFSRPRDIAGQPGAV	450
A.h. HoxC	VPAMEHWIQSVRIGEF-----CFSPSTLPSDVGVLTEAARGSLGHWSVIREGRIANYQIVAPTSWNFSRPRDSAGTPGAL	450
R.c. HupV	QLLMEFWAALDPGAV-----FMVQGRMPETGAGAGLVEAARGSLGHWLRIEGGKIASYQIIAPTWNFSRPRDSAGVGPFL	441
B.j. HupV	ALAMEQWTRALRLSEP-----FCNNAREIFDGSYVGLVEAARGSLGHWMVAVSQGRIERYQIIAPTWNFSRPRDSFVVGPL	444
R.e. HoxG	HSDWHDLVANIRAGDTATANVDKWDPAFWPLQARGVGTVAPRAGALGHWIRIKDGRIENYQCVVPTTWNGSPRDYKQGIGAF	569
R.c. HupL	KHFFDLVTVNIKNGDSSSTANVEKWDPTWPKKARGVGMTEAPRAGALGHWVIRIKDGRIENYQCVVPTTWNGSPRDSKGNIGAF	548
B.j. HupL	RHPQDLVTVNIKAGNTATADISRWRPETWKEARGYGFTEAPRAGALGHWITIKDAKIDNYQCVVPTTWNGSPRDSGNTIGAF	547
D.g. HydB	EVWLDKLEANVKAGKD-----DLYTDWQYPTESQVGFVNAPRGMGLSHWIVQRGGKIENFQHVVPSTWNLGPRCAERKLSAV	502
Motiv L4: GxxxxPRGxxxH		
R.e. HoxC	EKALEGAPVLQGETTPVAVQHIIVRSFDFPCMVCTVH-----	485
A.h. HoxC	EAALVGAPVMTDEQTPVAVQHIIVRSFDFPCMVCTVH-----	485
R.c. HupV	EAALVGAPVAPGEDSPVAVQHVRSFDFPCMVCTVH-----	476
B.j. HupV	EQALVGTVDGDAGRFAVAIQHIIVRSFDFPCMVCTAH-----	479
R.e. HoxG	EASLMTFVVNPE-QPVEILRTLHSFDFCLACSTHVMASAEQELTTVKVR	618
R.c. HupL	EASLLNTKMERPE-EPVEILRTLHSFDFCLACSTHVMASAEQAPLTTVKVR	597
B.j. HupL	EASLIGTFMADPQ-RPLEILRTIHSFDFCLACSTHVMSEHGQEMASIRVR	596
D.g. HydB	EQALIGTFIADPK-RPVEILRTVHSYDFEACGVHVDIPESNQVHKFRIL	551
Motiv L5: DPCxxCxxH		

Abb. 22: Vergleich der Aminosäuresequenzen der großen Hydrogenase-Untereinheit HoxC von *R. eutropha* (R.e. HoxC; SwissProt-Datenbank-Nr.: P95604) mit homologen Sequenzen der H₂-Sensoren aus *A. hydrogenophilus* (A.h. HoxC; P94155), *R. capsulatus* (R.c. HupV; O86457) und *B. japonicum* HupV; Q45255), den Sequenzen der großen Untereinheiten membrangebundener [NiFe]-Hydrogenasen aus *R. eutropha* (R.e. HoxG; P31891), *R. capsulatus* (R.c. HupL; P15284) und *B. japonicum* (B.j. HupL; P12636). Weiterhin wurde die Sequenz der großen Untereinheit der periplasmatischen [NiFe]-Hydrogenase von *D. gigas* (D.g. HydB; P12944) in den Vergleich mit eingebracht. Die konservierten Motive L0 bis L5 sind grau unterlegt.

Die Konsensusmotive L1 und L5 in den H₂-Sensoren weichen nicht von denen der energieliefernden [NiFe]-Hydrogenasen ab. Dagegen sind in den Motiven L0, L2, L3 und L4 der H₂-Sensoren signifikante Abweichungen in der Aminosäuresequenz zu erkennen. So ist im L0-Motiv an Stelle eines konservierten Histidins in den Sensoren ein Aspartat zu finden. Im Motiv L2 ist das konservierte Histidin in energieliefernden [NiFe]-Hydrogenasen durch Glutamat, im L4-Motiv das konservierte Prolin durch Alanin in den H₂-Sensoren ersetzt. Die größten Abweichungen sind in dem Motiv L3 zu finden. Von den sieben konservierten Aminosäuren HxHxxHxxHLHxL sind in den H₂-Sensoren nur zwei Histidine konserviert. Die Aminosäuresequenz Histidin-Leucin-Histidin aus dem L3-Motiv sind in den H₂-Sensoren durch eine Leucin/Isoleucin-Phenylalanin-Phenylalanin-Sequenz ersetzt. Neben den Abweichungen in den Konsensusmotiven weisen die H₂-Sensoren auch noch besondere Sequenzabschnitte auf, die bereits an Hand des 3D-Modells der RH (Abb. 15) gezeigt wurden.

Um die Bedeutung der Abweichungen einzelner Aminosäuren in den H₂-Sensoren von den konservierten Motiven der Standard-[NiFe]-Hydrogenasen für die enzymatischen und regulatorischen Eigenschaften der RH genauer zu überprüfen, wurden durch ortsgerichtete Mutagenese einzelne Aminosäuren in der großen Untereinheit ausgetauscht (Abb. 23).

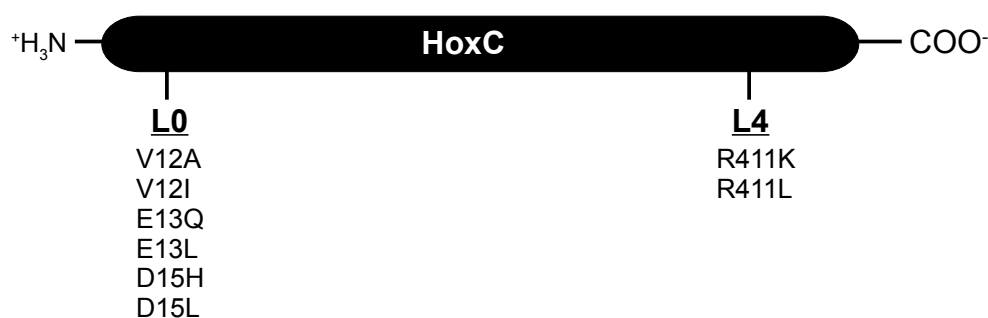


Abb. 23: Übersicht über Nukleotidaustausche in *hoxC*. Dargestellt sind die Aminosäuren des Wildtyp-Proteins, ihre Position und der durch ortsgerichtete Mutagenese ausgetauschte Aminosäurerest. L0 und L4 beschreiben die Zugehörigkeit zu den konservierten Motiven.

3.5.1.1 Austausch im L4- und L0-Motiv von HoxC

Eine Analyse der Kristallstruktur der [NiFe]-Hydrogenase von *Desulfovibrio gigas* zeigt, dass sich das L4-Motiv in der unmittelbaren Umgebung der diatomaren Liganden des Eisens am [NiFe]-Zentrum befindet (Abb. 24). Es wird postuliert, dass das konservierte Arginin R463 (*D. gigas* Aminosäurenummerierung) am Katalysemechanismus von Standard-[NiFe]-Hydrogenasen direkt beteiligt ist (Stein *et al.* 2001).

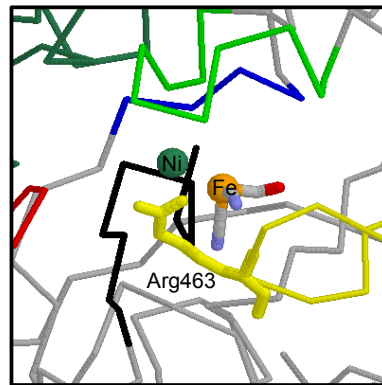


Abb. 24: Position des Arg463 im L4-Motiv der großen Untereinheit der [NiFe]-Hydrogenase von *D. gigas*.

Um zu überprüfen, ob diese Annahme auch für die H_2 -Sensoren getroffen werden kann, wurde das Arginin an der Position 411 der großen Untereinheit HoxC von *R. eutropha* der RH gegen Lysin (K) und Leucin (L) ausgetauscht. Beide Mutationen wurden durch PCR-Mutagenese in vitro erzeugt. Durch den Austausch der Nukleotide GCG→CAG sowie GCG→CTT wurde in *hoxC* das Codon für R411 in das Leucin- bzw. Lysincodon umgewandelt. Die genetischen Konstruktionen sind in Kapitel 2.14.1.1 detailliert beschrieben. Die *hoxC*-Allele werden im folgenden als *hoxC*[R411K] bzw. *hoxC*[R411L] bezeichnet.

Die nähere Betrachtung der Kristallstruktur der [NiFe]-Hydrogenase von *D. gigas* zeigt, dass das L0-Motiv nahe der Kontaktfläche zwischen der großen Untereinheit HydB und der kleinen Untereinheit HydA lokalisiert ist. Die Abbildung 25 macht anschaulich, dass die Aminosäurereste des L0-Motivs potentielle Kandidaten für die direkte Interaktion zwischen beiden Untereinheiten darstellen.

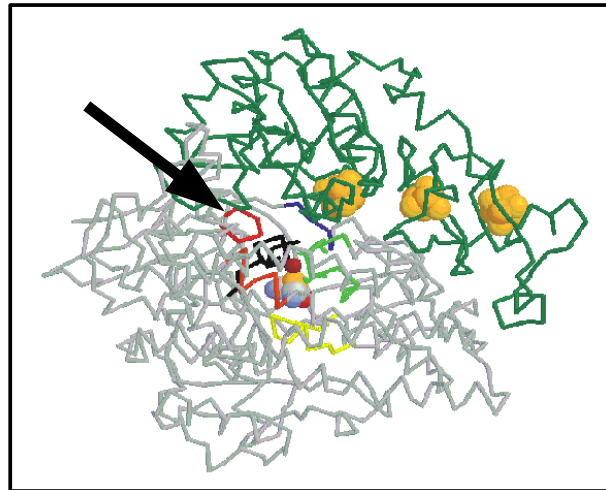


Abb. 25: Modell der Kristallstruktur der periplasmatischen [NiFe]-Hydrogenase von *D. gigas*. Grau gezeichnet ist die große Untereinheit mit dem [NiFe]-Zentrum. Die sechs konservierten Bereiche in der Aminosäuresequenz in der katalytischen Untereinheit sind farblich hervorgehoben: rot zeigt das L0-Motiv, blau das L1-Motiv, grün das L2-Motiv, orange das L3-Motiv, gelb das L4-Motiv und schwarz das L5-Motiv. Die kleine Untereinheit ist dunkelgrün abgebildet. Die drei FeS-Cluster sind als orange-gelbe Kugeln dargestellt. Der Pfeil hebt die Position des L0-Motivs hervor.

Das L0-Motiv zeigt für die energieliefernden [NiFe]-Hydrogenasen die Sequenz RxEGH. Für das hoch konservierte Glutamat (E) an der Position 18 in der *D. gigas* Hydrogenase wird angenommen, dass es an dem Protonentransfer vom aktiven Zentrum zur Proteinoberfläche beteiligt ist (Dementin *et al.* 2004). Um diese Annahme für die H₂-Sensoren zu überprüfen, wurde das entsprechende Glutamat 13 in HoxC gegen Glutamin (Q) bzw. Leucin (L) getauscht. Das in allen H₂-Sensoren konservierte Valin (V) an der Position 12 in HoxC von *R. eutropha* wurde gegen Alanin (A) bzw. Isoleucin (I) ausgetauscht. Alanin und Isoleucin sind im chemischen Charakter dem des Valins gleich und unterscheiden sich lediglich in der Größe. Die energieliefernden [NiFe]-Hydrogenasen besitzen an Stelle des Valins ein Isoleucin (Abb. 22). An Stelle des konservierten Histidins (H) im L0-Motiv befindet sich in den Sequenzen aller bisher bekannten H₂-Sensoren ein Aspartat (D). Zur Untersuchung der Bedeutung dieser Abweichung wurde das entsprechende D15 in HoxC durch Histidin bzw. Leucin ersetzt. Die genetischen Konstruktionen sind in den Kapiteln 2.14.1.2-4 näher erläutert.

3.5.1.2 Auswirkung von Aminosäure-Austauschen auf das lithoautotrophe Wachstum

Das chemolithoautotrophe Wachstum diente als erster Test, um festzustellen, inwieweit sich ausgewählte Austausche der Aminosäuren im L0-Motiv auf die H₂-Sensierung und somit auf die Regulation der Hydrogenase-Genexpression auswirken. Die Plasmide mit Aminosäure-Austauschen in HoxC wurden konjugativ in ein *R. eutropha* HF433-Derivat

übertragen und *in trans* unter hohen und niedrigen O₂-Konzentrationen angezogen. Der Stamm HF433 trägt einen Serin→Gly Austausch an der Position 422 in HoxJ, wodurch die Kinase-Aktivität von HoxJ wieder hergestellt wird und die Hydrogenase-Genexpression in *R. eutropha* nur durch Indikation von H₂ erfolgt. Aus vorangegangenen Experimenten ist bekannt, dass der Stamm *R. eutropha* HF433 unter den Standardbedingungen mit 80 % H₂, 10 % CO₂ und 10 % O₂ sowohl in Flüssigkultur als auch auf festen Nährmedien ein deutlich verlangsamtes Wachstum gegenüber dem Wildtyp *R. eutropha* H16 aufweist (Lenz 1998). Nach dem Herabsetzen der Sauerstoff-Konzentration von 10 % auf 5 % in der Gasatmosphäre konnte auf festen Nährmedien kein Unterschied mehr in der Wachstumsgeschwindigkeit festgestellt werden. In Gegenwart von 20 % O₂ in der Gasatmosphäre ist der Stamm HF433 nicht mehr in der Lage, mit Wasserstoff als alleiniger Energiequelle auf Agarplatten zu wachsen (Lenz 1998). Der Wildtyp-Stamm *R. eutropha* H16 ist dagegen in der Lage, unter hohen Sauerstoff-Konzentrationen lithoautotroph zu wachsen. Die Zellen lassen sich in einer Gasatmosphäre von 30 % O₂, 10 % CO₂ und 60 % H₂ kultivieren (Wilde & Schlegel 1982). Sowohl die auf H₂ reagierenden HF433-Derivate, als auch die H₂-unabhängigen *R. eutropha*-Stämme unterscheiden sich lediglich in der Aktivität der Histidin-Proteinkinase HoxJ (Lenz & Friedrich 1998). Folglich ist die O₂-Toleranz in Beziehung zu setzen mit der H₂-Signaltransduktionskette.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit konstruierten Plasmide mit den *hoxC*-Varianten wurden konjugativ in den Stamm *R. eutropha* HF435 überführt (Tab. 1). Die Hydrogenase-Genexpression ist in diesem Stamm, der eine Deletion im Strukturgen *hoxC* trägt, H₂-abhängig. SH und MBH sind intakt und dienen der Zelle zur Energiekonservierung. Das lithoautotrophe Wachstum wurde zunächst auf Agarplatten bei verschiedenen Gasatmosphären getestet. Dabei zeigten die *R. eutropha*-Stämme mit den Aminosäure-Austauschen HoxC[V12A] und HoxC[V12I] in *trans* kein Wachstum in Gegenwart von 10 % O₂, 70 % H₂, 10 % CO₂ und 10 % N₂. In Gegenwart von 5 % Sauerstoff wuchsen die beiden Mutanten gleich schnell. Ein entsprechender Wachstumstest mit *R. eutropha*-Stämmen, die die Aminosäure-Austausche HoxC[D15L] und HoxC [D15H] in *trans* trugen, zeigte ähnliche Ergebnisse (Abb. 26). In Gegenwart von 5 % Sauerstoff ließ sich im Wachstum der beide Stämme HF435(pHoxC[D15H]) und HF435(pRH-WT) kein Unterschied feststellen. Ein leicht verzögertes Wachstum war unter diesen Bedingungen für den Stamm HF435(pHoxC[D15L]) zu beobachten, während die beiden Stämme HF435 und HF371(pGE378) gar nicht wuchsen.

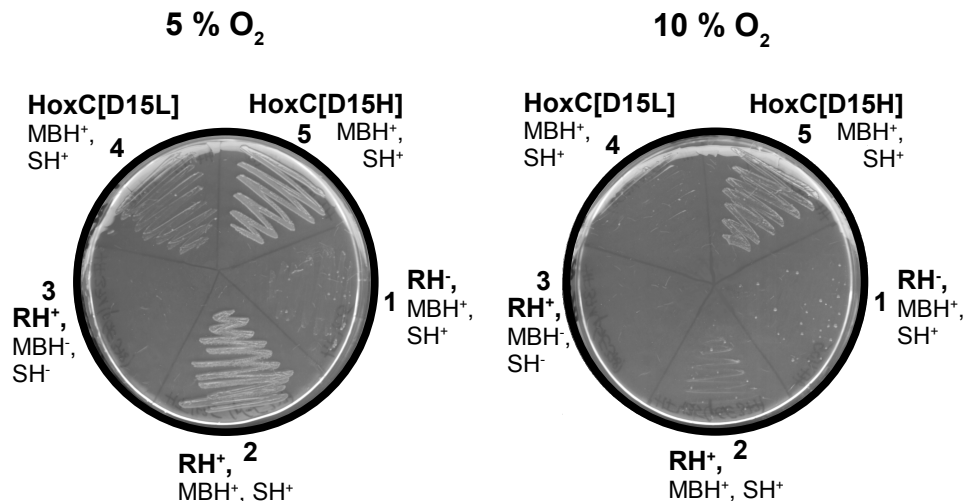


Abb. 26: Lithoautotrophes Wachstum von *R. eutropha*-Aminosäure-Austauschmutanten bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen. Die Stämme wurden für 8 Tage bei 30 °C in einer Gasatmosphäre von 70 % H₂, 10 % CO₂, 15 % N₂, 5 % O₂ bzw. 70 % H₂, 10 % CO₂, 10 % N₂, 10 % O₂ kultiviert. Stämme: 1 HF435, 2 HF435(pGE378), 3 HF371(pGE378), 4 HF435(pGE543), 5 HF435(pGE538)

Der als Kontrolle dienende Stamm HF371(pGE378) ist im Besitz intakter RH-Gene auf dem Megaplasmid pHG1 und auf dem Überexpressionsplasmid pGE378, er trägt aber Deletionen in den Genen *hoxG* und *hoxH*, die für die großen Untereinheiten der beiden energieliefernden Hydrogenasen in *R. eutropha* kodieren. Somit ist dieser Stamm nicht in der Lage, den Wasserstoff als Energiequelle zu nutzen. In Gegenwart von 10 % Sauerstoff war für den Stamm HF435(pGE377) nur noch ein vermindertes Wachstum festzustellen, während der Stamm HF435(pGE538) mit dem Austausch HoxC[D15H] unter diesen Bedingungen noch gut wachsen konnte. Interessanter Weise hat der Stamm mit dem HoxC[D15H]-Austausch in Gegenwart hoher O₂-Konzentrationen seine H₂-sensierende Funktion beibehalten (Abb. 27). Die O₂-Toleranz ist demnach nicht die Folge eines einzelnen Aminosäure-Austauschs in HoxJ wie im Wildtyp H16, sondern beruht auf einer Änderung der Aminosäuresequenz nahe des H₂-bindenden Zentrums. Die Stämme HF435(pGE543) (HoxC[D15L]), HF435 und HF371(pGE378) wuchsen in Gegenwart von 10 % O₂ nicht.

Ausgehend von dem Ergebnis aus dem Wachstumstest der RH-Mutante HoxC[D15H] in *trans*, wurde der Austausch im L0-Motiv über Rekombination in den Stamm HF433 übertragen. Zur genaueren Bestimmung der Sauerstofftoleranz des resultierenden Stammes *R. eutropha* HF657 im Vergleich zu den Kontrollstämmen H16 und HF433, erfolgten Anzuchten unter verschiedenen Gasatmosphären. Mit Hilfe der optischen Dichte

(OD_{436nm}) konnte das Wachstum verfolgt und die Verdopplungszeit der Stämme unter dem Einfluss verschiedener Gasgemische bestimmt werden. Die Ergebnisse dieses Tests sind in der Tabelle 10 zusammengestellt.

Tab. 10: Autotrophes Wachstum mit H₂ bei unterschiedlichen O₂-Konzentrationen

Stamm	Relevante Eigenschaften	Verdopplungszeit [h] ^(a)	
		5 % O ₂ ^(b)	20 % O ₂ ^(c)
HF657	HoxC[D15H]	4.8	10.4
HF433	RH ⁺ , HoxJ ⁺	5.6	13.3
H16	RH ⁺ , HoxJ ⁻	2.9	3.5

^(a) Zellen wurden lithoautotroph über einen Zeitraum von 100 h in Mineralmedium kultiviert und mit Hilfe der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von $\lambda=436$ nm das Wachstum verfolgt.

^(b) Wachstum in Gegenwart von 70 % H₂, 10 % CO₂, 15 % N₂ und 5 % O₂

^(c) Wachstum in Gegenwart von 70 % H₂, 10 % CO₂ und 20 % O₂

Der geringe Unterschied zwischen den Verdopplungszeiten der Stämme HF433 und HF657 in Flüssigkultur lässt sich unter anderem auf einen permanenten Sauerstoffmangel in den Kulturen zurückführen. Beim Wachstum auf Agarplatten sind die Bakterienkolonien O₂-exponierter als in Flüssigkultur, wodurch sich die erhöhte O₂-Toleranz der HoxC[D15H]-Mutante nachweisen ließ.

3.5.1.3 Einfluss der Aminosäure-Austausche auf die H₂-sensierende Aktivität

Welche Auswirkungen die Aminosäure-Austausche auf die H₂-sensierende Aktivität der einzelnen RH-Mutantenproteine hat, lässt sich mit der Aktivität der β -Galaktosidase bestimmen, die als Reporter für die H₂-abhängige Regulation der Hydrogenase-Genexpression dient. Die Expressionsplasmide mit den Austauschen der Aminosäuren in den konservierten Motiven von *hoxC* wurden vom Donor *E. coli* S17-1 konjugativ nach *R. eutropha* HF570 übertragen. Der Empfängerstamm HF570 ist eine SH-, MBH- und RH-negative Mutante, in der die Hydrogenase-Genexpression auf Grund eines aktiven HoxJ-Proteins H₂-induzierbar ist. Des weiteren ist dieser Stamm durch eine chromosomale $\Phi(hoxK'-lacZ)$ -Fusion charakterisiert, die es erlaubt, den Effekt von H₂ auf die Hydrogenase-Genexpression bei Wachstum der Transkonjuganten in FGN-Medium mit und ohne Wasserstoff zu testen. In Zellen, die in Abwesenheit von H₂ angezogen wurden, war keine Induktion des MBH-Promotors zu messen. Die Aktivität der β -Galaktosidase ließ sich ausschließlich in den Zellen detektieren, die in Gegenwart von H₂ angezogen worden sind (Abb. 27).

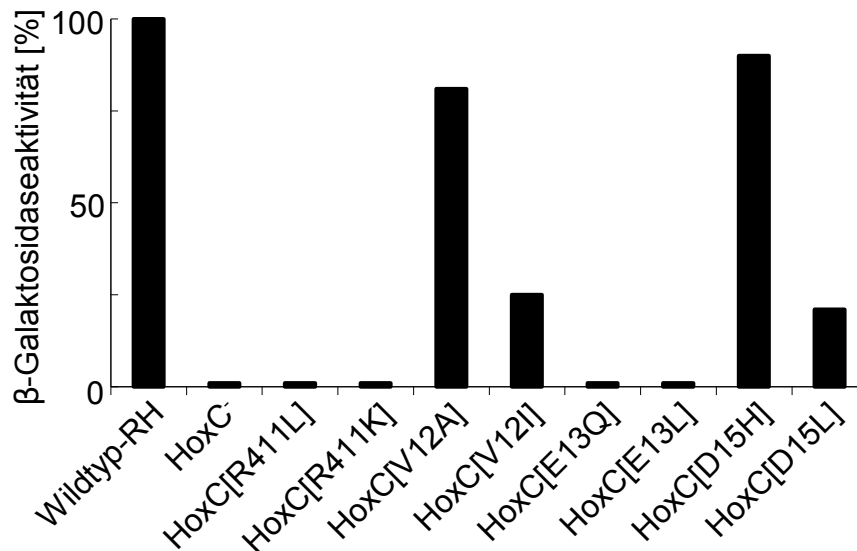


Abb. 27: H₂-Sensierung der RH-Mutantenproteine. Die $\Phi(hoxK'-lacZ)$ -Fusion war in *R. eutropha* HF570 in die *norR2A2B2*-Region des Chromosoms integriert. Die Expression der RH erfolgte nach dem Einfügen der mutierten *hoxC*-Allele auf den entsprechenden pGE377-Derivaten in HF570. Die *R. eutropha*-Stämme wurden in FGN-Medium in Gegenwart von H₂ kultiviert. Die Zellen wurden bei einer OD_{436nm} von 8.0±0.3 geerntet. Die β-Galaktosidase-Aktivität wurde nach dem Protokoll von Miller et al. (1972) bestimmt. Relevante Eigenschaften: Wildtyp-RH, HF570(pGE377); RH⁻, HF570(pEDY309); HoxC[R411L], HF570(pGE511); HoxC[R411K], HF570(pGE512); HoxC[V12A], HF570(pGE541); HoxC[V12I], HF570(pGE540); HoxC[E13Q], HF570(pGE539); HoxC[E13L], HF570(pGE542); HoxC[D15H], HF570(pGE538); HoxC[D15L], HF570(pGE543)

Die Abbildung 27 zeigt, dass die Austausche R411K, R411L, E13Q bzw. E13L in HoxC zum vollständigen Verlust der H₂-sensierenden Funktion der RH führten. Der Austausch von V12A bzw. V12I hatte eine Abnahme der H₂-Induzierbarkeit des MBH-Promotors um 19 % bzw. um 75 % zur Folge. Die regulatorische Aktivität der D15L-Mutante betrug nur noch 21 % und die der D15H-Mutante etwa 90 % der Wildtyp-Aktivität.

3.5.1.4 Katalytische Eigenschaften der modifizierten RH-Proteine

Neben dem Einfluss der Aminosäure-Austausche in den konservierten Motiven L0 und L4 auf die regulatorischen Eigenschaften wurden die Auswirkungen der Mutationen auf die katalytischen Eigenschaften der RH untersucht. Für die nachfolgenden biochemischen Untersuchungen wurden die pGE377-Derivate pGE511 (*hoxC*[R411L]), pGE512 (*hoxC*[R411K]), pGE541 (*hoxC*[V12A]), pGE540 (*hoxC*[V12I]), pGE539 (*hoxC*[E13Q]), pGE542 (*hoxC*[E13L]), pGE538 (*hoxC*[D15H]) und pGE543 (*hoxC*[D15L]) konjugativ aus *E. coli* S17-1 in den Rezipienten *R. eutropha* HF574 übertragen. In diesem Stamm sind neben den Strukturgenen *hoxBC* für die RH auch die Gene *hoxG* und *hoxH* deletiert, die für die großen Untereinheiten der MBH und der SH kodieren. Der Stamm wurde ausgewählt, um Überlagerungen der

Aktivitäten der Hydrogenasen des Wirts mit den Aktivitäten der Plasmid-kodierten RH-Mutantenproteine auszuschließen. Das HoxJ-Protein ist in diesem Stamm inaktiv, wodurch eine H₂-unabhängige Expression der auf den pGE377-Derivaten kodierten RH-Gene ermöglicht wird.

Die Transkonjuganten wurden heterotroph unter Hydrogenase-dereprimierenden Bedingungen in FGN kultiviert und daraus lösliche Extrakte gewonnen. In diesen Extrakten wurde anschließend amperometrisch die H₂-oxidierende Aktivität der RH-Mutantenproteine mit Methylenblau als Elektronenakzeptor und die D₂/H⁺-Austauschreaktion gemessen. Der Prozess der H₂-Oxidation in Gegenwart eines Redox-Farbstoffs schließt sowohl die H₂-Spaltung am aktiven Zentrum, als auch den Protonen- und Elektronentransport mit ein. Die D₂/H⁺-Austauschreaktion (Messung durch A. De Lacey, Madrid) beschreibt die H₂-Spaltung am aktiven Zentrum unabhängig von einem Elektronenakzeptor. Die Ergebnisse aus den Messungen sind in der Tabelle 11 zusammengefasst.

Tab. 11: RH-Aktivitäten in *R. eutropha*-Derivaten mit Aminosäure-Austauschen in HoxC

Stamm	Relevante Eigenschaften	Motiv	Spezifische Aktivität ^(a) [%]	
			H ₂ -Oxidation ^(b)	D ₂ /H ⁺ -Austausch ^(c)
HF574(pGE377)	Wildtyp-RH		100	100
HF574(pEDY309)	HoxC ⁻		0	0
HF574(pGE511)	HoxC[R411L]	L4	0	0
HF574(pGE512)	HoxC[R411K]	L4	0	0
HF574(pGE541)	HoxC[V12A]	L0	83	92
HF574(pGE540)	HoxC[V12I]	L0	69	209
HF574(pGE539)	HoxC[E13Q]	L0	0	0
HF574(pGE542)	HoxC[E13L]	L0	0	0
HF574(pGE538)	HoxC[D15H]	L0	4	99
HF574(pGE543)	HoxC[D15L]	L0	1	0

^(a) 100 % Aktivität entsprechen folgenden Werten: H₂-oxidierende Aktivität, 0.036 U/mg Protein, D₂/H⁺-Austauschaktivität, 0.110 U/mg Protein

^(b) Die H₂-oxidierende Aktivität wurde amperometrisch mit Methylenblau als Elektronenakzeptor gemessen.

^(c) Die D₂/H⁺-Austauschaktivitäten wurden an löslichen Extrakten von heterotroph gewachsenen Zellen bei 30 °C in MES-Puffer (50 mM, pH 5.5, gesättigt mit 20 % D₂ in Ar) gemessen.

Die Austausche des Valins sowohl durch Alanin als auch durch Isoleucin im L0-Motiv führten in beiden Fällen zu einer leichten Abnahme der H₂-oxidierenden Aktivität. Überraschenderweise wurde für die RH-Variante HoxC[V12I] im D₂/H⁺-Austausch eine Aktivität von 209 % gemessen (Tab. 11). Alle anderen Austausche im L0-Motiv sowie

im L4-Motiv führten entweder zu einer drastischen Abnahme oder zum vollständigen Erliegen der H_2 -oxidierenden Aktivität. Erstaunlicherweise konnte für das HoxC[D15H]-Protein mit einer H_2 -oxidierenden Aktivität von nur 4 %, eine D_2/H^+ -Austauschaktivität von ca. 99 %, verglichen mit der des Wildtyp-Proteins, gemessen werden. Für die Austausche R411K, R411L, E13Q, E13L und D15L in HoxC war keine D_2/H^+ -Austauschaktivität nachweisbar. In fast allen Fällen wurde bei der Umsetzung von D_2 ausschließlich die Bildung von H_2 , nicht aber die Bildung des Zwischenproduktes HD beobachtet. Diese Besonderheit ist schon für das RH-Wildtyp-Protein beschrieben worden (Bernhard *et al.* 2001). Die einzige Ausnahme stellte das Protein der Mutante HoxC[V12I] dar, für das erstmalig das Zwischenprodukt HD nachweisbar war.

3.5.1.5 *Para-H₂-/ortho-H₂-Konversion ausgewählter RH-Mutantenproteine*

Mit Hilfe der Umwandlung von *para*- H_2 in *ortho*- H_2 (Messung durch A. de Lacey, Madrid) sollte nun überprüft werden, ob eine Bindung von H_2 am aktiven Zentrum jener Mutantenproteine erfolgen kann, die keine H_2 -oxidierende Aktivität und keine D_2/H^+ -Austauschaktivität mehr zeigten. Zusätzlich wurden Mutantenproteine diesem Test unterzogen, die sich durch besondere biochemische Eigenschaften auszeichneten. Die Proteine wurden einem definierten Verhältnis aus *para*- H_2 und *ortho*- H_2 ausgesetzt und die Umwandlung von *para*- H_2 in *ortho*- H_2 durch Änderungen der Wärmeleitfähigkeit verfolgt. Um ein Isomer in das andere zu überführen, ist eine Spaltung der H-H-Bindung erforderlich. Externe Elektronenakzeptoren und Protonentransferreaktionen werden bei dieser Messung nicht benötigt. Der Stamm *R. eutropha* HF574(pGE377) und die Transkonjuganten mit den Austauschen HoxC[R411K], HoxC[E13Q], HoxC[E13L], HoxC[D15H] und HoxC[V12I] wurden unter heterotrophen Bedingungen in FGN-Medium angezogen und daraus lösliche Extrakte hergestellt. Unter Ausnutzung der Komplexbildung zwischen der RH und der als Hexahistidin-Fusionsprotein vorliegenden Histidin-Protein-Kinase HoxJ war es möglich, Wildtyp-RH und die RH-Mutantenproteine anzureichern, an denen die *para*- H_2 -/*ortho*- H_2 -Konversionsaktivität gemessen wurde. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 12 zusammengestellt.

Tab. 12: *Para*-H₂-/*ortho*-H₂-Konversionsaktivitäten der Mutantenproteine

Stamm	Relevante Eigenschaften	<i>para</i> -H ₂ -/ <i>ortho</i> -H ₂ -Konversionsaktivität ^(a)
HF574(pGE377)	Wildtyp-RH	++
HF574(pGE512)	HoxC[R411K]	-
HF574(pGE539)	HoxC[E13Q]	+
HF574(pGE542)	HoxC[E13L]	+
HF574(pGE538)	HoxC[D15H]	++
HF574(pGE540)	HoxC[V12I]	+

^(a) Die Konversionsaktivitäten wurden an angereicherten RH-HoxJ^{Input}-Fusionsproteinen in 50 mM Tris-HCl, pH 8 in Gegenwart von Na-Dithionit unter *para*-angereichertem H₂ gemessen. Es wurde unterschieden zwischen voller Wildtyp-Aktivität (++), verminderter Aktivität (+) und keiner Aktivität (-).

Der D15H-Austausch im L0-Motiv scheint keinen Einfluss auf die *para*-H₂-/*ortho*-H₂-Konversionsaktivität zu haben. Das HoxC[V12I]-Protein zeigt eine leicht verminderte Konversionsaktivität und für das HoxC[R411K]-Protein ließ sich keine H₂-Bindung am katalytischen Zentrum nachweisen. Das HoxC[R411L]-Protein wurde diesem Test nicht unterzogen, da es sehr instabil war und sich daher nur schlecht anreichern ließ. Der Austausch des konservierten Glutamats an der Position 13 im L0-Motiv von HoxC gegen Glutamin bzw. Leucin führte in beiden Fällen zum vollständigen Verlust der H₂-oxidierenden Aktivität und der D₂/H⁺-Austauschaktivität. Beide Mutantenproteine wiesen jedoch eine partielle *para*-/*ortho*-H₂-Konversionsaktivität auf (Tab. 12). Eine Bindung von H₂ an das aktive Zentrum dieser Mutanten findet demnach noch statt.

3.5.1.6 Stabilität der modifizierten RH-Proteine

Die Austausche konservierter Aminosäuren in den Motiven L0 und L4 führten zu einer Abnahme oder zum vollständigen Erliegen der H₂-oxidierenden Aktivität der Mutantenproteine. In einem immunologischen Test wurde im folgenden untersucht, inwieweit die verminderten Aktivitäten bzw. die vollständige Inaktivierung der RH-Proteine mit der Stabilität der Untereinheiten HoxC und HoxB korrelieren.

Lösliche Extrakte von heterotroph kultivierten Zellen wurden auf das Vorhandensein der RH-Untereinheiten untersucht. Der Vergleich der Bandenintensität der RH-Untereinheiten HoxC und HoxB im Immunoblot (Abb. 28), macht deutlich, dass nicht in allen Extrakten gleiche Mengen der entsprechenden Untereinheiten vorhanden waren. Für das Wildtyp-Protein war ein deutliches Signal für HoxC bei 52 kDa zu erkennen.

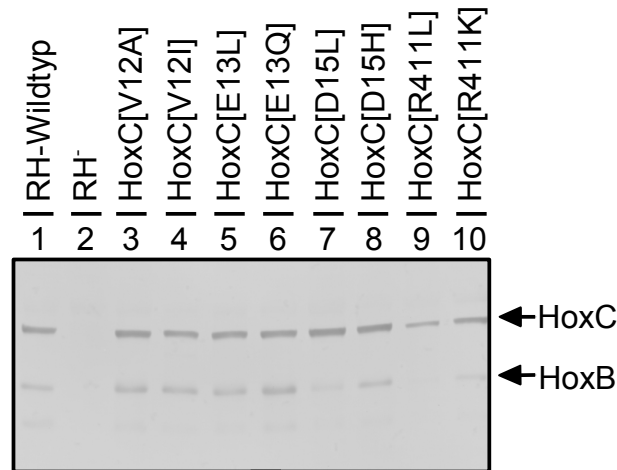


Abb. 28: Stabilität der RH-Mutantenproteine im Immunoblot. Lösliche Extrakte von FGN-gezogenen Zellen der RH-überproduzierenden Transkonjuganten wurden im 12 %igen SDS-Gel aufgetrennt und geblottet. Pro Spur wurden 20 µg Protein aufgetragen. Der Nachweis der Untereinheiten erfolgte mit einem Antikörper gegen HoxBC.

Spuren: 1 HF574(pGE377), 2 HF574(pEDY309), 3 HF574(pGE541), 4 HF574(pGE540), 5 HF574(pGE542), 6 HF574(pGE539), 7 HF574(pGE543), 8 HF574(pGE538), 9 HF574(pGE511), 10 HF574(pGE512)

Mit Ausnahme der RH-Mutante HoxC[R411L] wiesen alle Mutantenproteine (Spuren 3 bis 8, 10) die gleiche Intensität wie die Wildtyp-RH auf. Die Untereinheit HoxC lag in diesen Mutantenproteinen gleichermaßen stabil vor. Der Aminosäure-Austausch R411L führte zur Bildung einer weniger stabilen großen Untereinheit HoxC (Spur 9).

Der immunologische Nachweis der kleinen Untereinheit HoxB zeigte ein intensives Signal bei 36 kDa (Abb. 28, Spur 1) für den Wildtyp. Die Signalintensitäten für die Mutantenproteine unterschieden sich zum Teil deutlich von der Signalintensität des Wildtyp-Proteins (Spuren 7, 9 und 10). Hier kann davon ausgegangen werden, dass die Austausche R411L, R411K und D15L in der großen Untereinheit zu einer Destabilisierung der kleinen Untereinheit führen.

3.5.1.7 Nickel-Inkorporation in HoxC

Im weiteren soll festgestellt werden, ob das Fehlen der H_2 -Oxidation und der D_2/H^+ -Austauschaktivität in einigen Mutantenproteinen (Tab. 11) auf das Fehlen von Nickel im aktiven Zentrum zurückzuführen ist. Zu diesem Zweck wurden lösliche Extrakte von in ^{63}Ni -supplementiertem Medium angezogenen Zellen mittels nativer PAGE aufgetrennt. Das ^{63}Ni -markierte HoxC ließ sich durch Autoradiographie identifizieren (Abb. 29). Der Referenzstamm HF574(pGE377) weist zwei ^{63}Ni -Signale auf (Spur 1), die mit den Signalen des Doppeldimers $(\text{HoxBC})_2$ und des Dimers HoxBC korrelieren (Abb. 17).

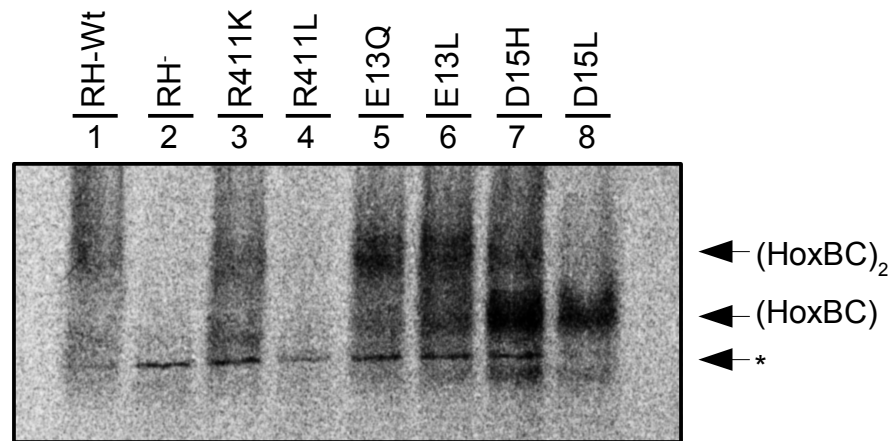


Abb. 29: Auswirkung von Aminosäure-Austauschen in HoxC auf die Inkorporation von ^{63}Ni . Analyse von löslichen Extrakten nach Auftrennung durch native PAGE. Die Zellen wurden in Gegenwart von 180 nM $^{63}\text{NiCl}_2$ angezogen. Pro Spur wurden 400 μg Protein aufgetragen. *Spuren:* 1 HF574(pGE377), 2 HF574(pEDY309), 3 HF574(pGE512), 4 HF574(pGE511), 5 HF574(pGE539), 6 HF574(pGE542), 7 HF574(pGE538), 8 HF574(pGE543), * Hydrogenase-unspezifisches Signal

Von den sechs Aminosäure-Austauschmutanten zeigt nur der Stamm HF574(pGE511), in dem das konservierte R411 durch Leucin ersetzt wurde, kein RH-spezifisches Signal (Abb. 29, Spur 4). Das RH HoxC[R411K]-Protein zeigte dagegen die beiden typischen RH-Signale (Spur 3). Die Austausche E13 und D15 im L0-Motiv lieferten deutliche RH-Signale (Spuren 5 bis 8). Auffällig war, dass beim Austausch von D15 nach Leucin lediglich das Signal für das HoxBC-Dimer detektiert wurde (Spur 8). Aus Immunoblot-Analysen ging hervor, dass auch diese Mutante in der Lage war, das RH-Doppeldimer zu bilden (Daten nicht gezeigt). Die kleine Untereinheit HoxB der D15L-Mutante wurde im Immunoblot als weniger stabil nachgewiesen, verglichen mit dem Wildtyp-Protein (Abb. 28, Spuren 1 und 7). Vermutlich sind proteolytische Prozesse an der C-terminalen Extension der kleinen Untereinheit der RH HoxC[D15L] dafür verantwortlich, dass das Doppeldimer nicht stabil vorlag. Eine in allen löslichen Extrakten detektierte schnell laufende Proteinbande (Abb. 29, mit * gekennzeichnet) ist Hydrogenase-unspezifisch, da sie auch im löslichen Extrakt des als Negativkontrolle mitgeführten Stammes HF574(pEDY309) aufzufinden ist (Spur 2), der keine aktiven Hydrogenasen enthält. Ungeklärt ist, ob das unspezifische Signal von einem an der Maturation beteiligten Ni-haltigen Hyp-Protein stammt.

3.5.1.8 Komplexbildung der RH-Mutantenproteine mit der Histidin-Proteinkinase HoxJ

Der H₂-Sensor und die Histidin-Proteinkinase HoxJ von *R. eutropha* sind in der Lage, einen Komplex auszubilden, wobei die C-terminale Extension der kleinen Untereinheit HoxB essentiell für die Interaktion ist (Buhrke *et al.* 2004). Die Stabilität der kleinen Untereinheit in den RH-Mutantenproteinen und die direkte Interaktion mit der Histidin-Proteinkinase HoxJ lässt sich auch durch die Formation eines RH-HoxJ-Komplexes im nativen Gel sichtbar machen. Zu diesem Zweck wurden die Aminosäure-Austauschmutanten in FGN-Medium heterotroph angezogen und daraus löslicher Extrakt hergestellt. Die Kinase HoxJ wurde als Hexahistidin-Fusionsprotein heterolog in *E. coli* exprimiert und über Ni-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt. Lösliche Extrakte, die das RH-Mutantenprotein bzw. die Wildtyp-RH enthielten, wurden mit dem gereinigten HoxJ-His₆ gemischt, für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und direkt im Anschluss durch eine native PAGE im Gradientengel (4-15 %) aufgetrennt. Die Gele wurden geblottet und die entsprechenden Proteine mit Antikörpern gegen HoxB bzw. HoxJ detektiert.

Wie schon aus vorangegangenen Experimenten bekannt war, führte die Kombination der Wildtyp-RH mit der Histidin-Proteinkinase zu einem verlangsamten Laufverhalten im Gel, was auf die Bildung eines Komplexes mit höherem Molekulargewicht hindeutete (Bernhard *et al.* 2001, Buhrke *et al.* 2004). In der Abbildung 30 sind die Formationen der RH-HoxJ-Komplexe aufgezeigt. Bis auf eine Ausnahme sind alle Mutantenproteine in der Lage gewesen, einen Komplex mit der Histidin-Proteinkinase HoxJ einzugehen. Für das Mutantenprotein HoxC[R411L] waren keine RH-spezifischen Banden detektierbar, weder für das HoxBC-Doppeldimer noch für den RH-HoxJ-Komplex (Abb. 30, Spur 4). Das deutet auf die Instabilität des HoxC[R411L]-Proteins hin, die sich auch aus dem Immunoblot (Abb. 28, Spur 9) und dem Nickelautoradiogramm (Abb. 29, Spur 4) ergibt.

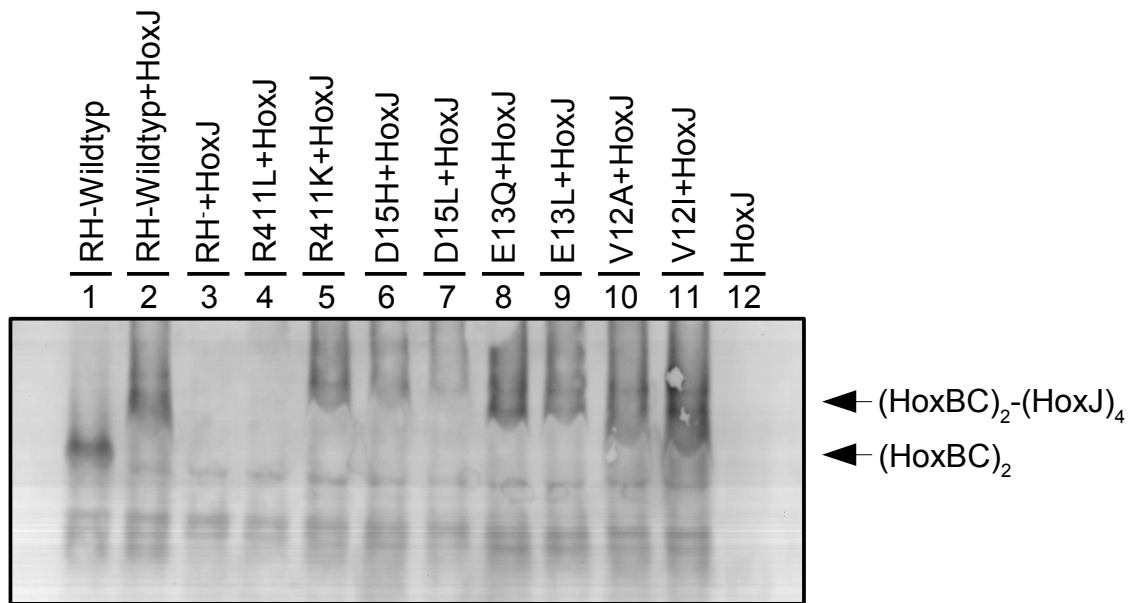


Abb. 30: Komplexbildung zwischen den RH-Mutantenproteinen und der Histidin-Proteinkinase HoxJ. *R. eutropha*-Stämme wurden in FGN angezogen. Je 50 µg löslicher Extrakt der RH-überproduzierenden Stämme wurden mit je 5 µg gereinigtem HoxJ gemischt, für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend durch eine native PAGE aufgetrennt. Der immunologische Nachweis der RH erfolgte mit einem anti-HoxB Antikörper. Relevante Eigenschaften: RH-Wildtyp, HF574(pGE377); RH⁻, HF574(pEDY309) und HoxJ; HoxC[R411L], HF574(pGE511) und HoxJ; HoxC[R411K], HF574(pGE512) und HoxJ; HoxC[D15H], HF574(pGE538) und HoxJ; HoxC[D15L], HF574(pGE543) und HoxJ; HoxC[E13Q], HF574(pGE539) und HoxJ; HoxC[E13L], HF574(pGE542) und HoxJ; HoxC[V12A], HF574(pGE541) und HoxJ; HoxC[V12I], HF574(pGE540) und HoxJ

Als Negativkontrollen dienten sowohl ein Ansatz bestehend aus HoxJ gemischt mit löslichem Extrakt des RH-negativen Stammes *R. eutropha* HF574(pEDY309) als auch gereinigtes HoxJ-Protein (Abb. 30, Spuren 3 und 12). In beiden Kontrollen waren keine RH-spezifischen Banden nachweisbar. Zur besseren Differenzierung des unterschiedlichen Laufverhaltens von Komplex und RH, wurde in der ersten Spur löslicher Extrakt des Wildtyp-Proteins aufgetrennt. Mit Hilfe des Antikörpers anti-HoxB ließ sich dort das HoxBC-Doppeldimer detektieren.

3.5.1.9 Spektroskopische Untersuchungen am [NiFe]-Zentrum der RH-Mutantenproteine

Um der Frage nachzugehen, wie sich die Aminosäure-Austausche in den konservierten Motiven auf das aktive Zentrum auswirken, wurden aus den entsprechenden RH-überproduzierenden *R. eutropha*-Stämmen Mutantenproteine nach der im Kapitel 2.9 beschriebenen Methode mit Hilfe des HoxJ^{Input}-His₆-Fusionsproteins angereichert und FTIR- und EPR-spektroskopisch untersucht (Messung durch A. de Lacey, Madrid).

Mittels FTIR-Spektroskopie wurden die Auswirkung der Aminosäure-Austausche auf die Präsenz und die Anzahl der diatomaren Liganden CN^- und CO untersucht. In der Abbildung 31 sind die FTIR-Spektren des Wildtyp-Proteins und der Mutantenproteine HoxC[D15H], HoxC[E13Q], HoxC[E13L], HoxC[V12I] und HoxC[R411K] abgebildet.

Im FTIR-Spektrum der Wildtyp-RH (Abb. 31 A) treten das für den CO-Liganden charakteristische Absorptionsmaximum bei 1943 cm^{-1} und die für die beiden CN^- -Liganden charakteristischen Maxima bei 2071 cm^{-1} und 2080 cm^{-1} auf (Pierik *et al.* 1998b). Das HoxC[D15H]-Mutantenprotein zeigt annähernd das gleiche Bandenmuster wie das Wildtyp-Protein mit etwa 20 % geringeren Maximalintensitäten. Das ist wahrscheinlich auf die geringere Stabilität des Mutantenproteins zurückzuführen. Da das HoxC[D15H]-Mutantenprotein nahezu 100 % der D_2/H^+ -Austauschaktivität (Tab. 11) und etwa 90 % der regulatorischen Aktivität aufweist (Abb. 27), scheint das aktive Zentrum intakt zu sein. Auch die Spektren des HoxC[V12I]-Mutantenproteins zeigen im Vergleich zum Spektrum der Wildtyp-RH ähnliche Positionen der CO- und CN^- -Banden mit um ca. 40 % verringerten Amplituden (Abb. 31). In den HoxC[E13Q/L]-Mutantenproteinen konnten die diatomaren Liganden nachgewiesen werden. In den angereicherten Proteinen waren zwei verschiedene Zustände mit CO-Banden bei 1965 cm^{-1} und 1957 cm^{-1} detektierbar.

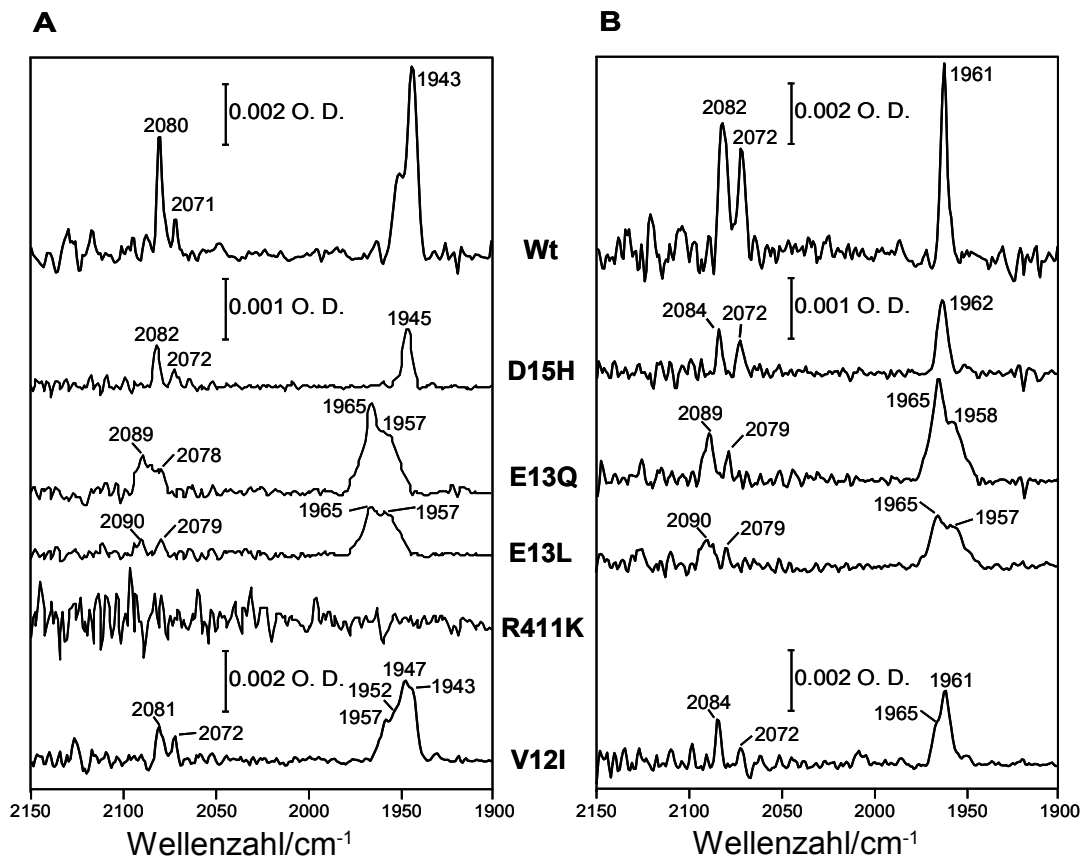


Abb. 31: FTIR-spektroskopischer Nachweis der CN⁻- und CO-Liganden in HoxC. Alle gemessenen Proben lagen als RH-HoxJ^{Input}-His₆ Fusionsprotein in (A) oxidiert und (B) reduzierter Form vor. Die Proteinkonzentrationen sind in Klammern angegeben. Die Spektren wurden bei Raumtemperatur aufgenommen. *Wt*, RH-Wildtyp HF574(pGE377) (36 mg/ml, Mittelwert aus 1024 Einzelmessungen); *D15H*, HF574(pGE538) (62 mg/ml, Mittelwert aus 1024 Einzelmessungen); *E13Q*, HF574(pGE539) (100 mg/ml, Mittelwert aus 1024 Einzelmessungen); *E13L*, HF574(pGE542) (89 mg/ml, Mittelwert aus 1024 Einzelmessungen); *R411K*, HF574(pGE512) (100 mg/ml, Mittelwert aus 1024 Einzelmessungen); *V12I*, HF574(pGE540) (45 mg/ml, Mittelwert aus 1024 Einzelmessungen).

Im Vergleich zum Wildtyp-Protein sind sowohl die CO-Absorptionsmaxima als auch die Absorptionen in der CN⁻-Region um 10-20 cm⁻¹ zur höheren Wellenzahl hin verschoben. Da die Infrarotspektren der HoxC[E13Q/L]-Mutantenproteine im oxidierten und in reduzierten Zustand keine Unterschiede aufwiesen, ist ein katalytisch inaktives Zentrum anzunehmen. Das stimmt mit der Beobachtung überein, dass die Mutantenproteine regulatorisch und katalytisch inaktiv sind. Das HoxC[R411K]-Mutantenprotein zeigte keine Absorptionen im FTIR-Spektrum (Abb. 31). Aus dem Nickelautoradiogramm (Abb. 29) geht jedoch hervor, dass Ni in die große Untereinheit HoxC eingebaut wurde.

Die EPR-Spektroskopie ermöglicht es, Aussagen über den Redox-Status des Nickels im katalytischen Zentrum der RH zu treffen. In der oxidierten RH befindet sich diamagnetisches Ni(II) im aktiven Zentrum, das bei der Reduktion mit H₂ in

paramagnetisches Ni(III) überführt wird. Im Ni-C-Zustand befindet sich ein Hydrid in der Brückenposition zwischen Ni und Fe (Brecht et al. 2003). Die angereicherten RH-Mutantenproteine wurden nach Inkubation mit H₂ auf die charakteristischen EPR-Signale im Ni-C-Zustand hin untersucht. In der Tabelle 13 sind die Ergebnisse der EPR-Spektroskopie zusammengefasst.

Tab. 13: EPR-spektroskopische Analyse der RH-Mutantenproteine

Stamm	Relevante Eigenschaften	Motiv	EPR (Ni-C) ^(a) g-Faktoren	
			oxidiert	reduziert mit H ₂
HF574(pGE377)	Wildtyp-RH		-	2.19, 2.14, 2.01
HF574(pGE512)	HoxC R411K	L4	2.16, 2.13, 2.01	2.16, 2.13, 2.01
HF574(pGE538)	HoxC D15H	L0	-	2.19, 2.14, 2.01
HF574(pGE539)	HoxC E13Q	L0	-	-
HF574(pGE542)	HoxC E13L	L0	-	-
HF574(pGE540)	HoxC V12I	L0	-	2.21, 2.19, 2.16, 2.02

^(a) Die RH-Proteine wurden mit Hilfe des HoxJ^{INPUT}-His₆-Fusionsprotein angereichert. Die EPR-Spektren wurden bei 77 K bei einer Modulationsfrequenz von 100 kHz und einer Modulationsamplitude von 2 Gauss aufgenommen. Die Leistung der eingestrahlten Mikrowellen (9.55 GHz) betrug 19.5 mW. Für die Spektren wurden 10 Einzelmessungen gemittelt.

Die Wildtyp-RH gab nach Reduktion mit H₂ ein Ni-C-Signal mit den g-Faktoren g₁=2.01, g₂=2.14 und g₃=2.19. Das Protein der HoxC[D15H]-Mutante zeigte das gleiche EPR-Verhalten wie das Wildtyp-Protein. Da auch das FTIR-Spektrum (Abb. 31) dem des Wildtyps entspricht, scheint die Struktur und die Funktion des aktiven Zentrums nicht beeinflusst zu sein. Das mittels HoxJ^{INPUT}-His₆-Fusionsprotein angereicherte HoxC[R411K]-Mutantenprotein, welches keine FTIR-Signale aufwies, enthielt überraschender Weise sowohl im oxidierten als auch im reduzierten Zustand paramagnetisches Nickel. An einem mittels *Strep*-tag-Technologie gereinigtem HoxC[R411K]-Protein ließen sich keine EPR-Signale detektieren. Das HoxC[V12I]-Mutantenprotein enthielt in Gegenwart von H₂ verschiedene paramagnetische Zustände. Dieses Protein erscheint in seiner Struktur sehr heterogen. Der Austausch von Val12 durch die größere Aminosäure Isoleucin mit gleichem chemischen Charakter, führte offensichtlich zu sterischen Veränderungen der Proteinumgebung des aktiven Zentrums, was die heterogenen spektroskopischen Eigenschaften bedingen kann. Für die beiden HoxC[E13]-Mutantenproteine konnte mittels EPR-Spektroskopie kein Ni-C-Signal detektiert werden. Möglicherweise befindet sich kein Hydrid als Brückenligand zwischen Ni und Fe im katalytischen Zentrum, wie es für den Ni-C-

Zustand im reduzierten Wildtyp-Protein angenommen wird (Brecht *et al.* 2003). Die EPR-Ergebnisse aus den Untersuchungen der HoxC[E13]-Mutantenproteine sind konform mit den FTIR-Resultaten. Die vom Wildtyp-Protein abweichenden FTIR-Spektren sind im oxidierten und reduzierten Zustand identisch. Die E13Q/L-Austausche hatten demnach drastische Auswirkungen auf die Struktur und Funktionalität des aktiven Zentrums.

4 Diskussion

4.1 Der H₂-sensierende Komplex von *Ralstonia eutropha*

Die Sensierung von Wasserstoff gehört mit zu den komplexesten Signalübertragungsprozessen in Prokaryoten. Die H₂-sensierende Signaltransduktionskette bewirkt die Expression der Hydrogenasegene in *R. eutropha*. Sie basiert auf einem aus den Proteinen HoxJ und HoxA bestehenden Zwei-Komponenten-System, das eine [NiFe]-Hydrogenase für die H₂-Sensierung nutzt. Diese so genannte regulatorische Hydrogenase (RH) liegt als lösliches Protein in der Zelle vor und wird posttranslational einem komplexen Maturationsmechanismus unterzogen, an dem sechs akzessorische Proteine beteiligt sind (Buhrke *et al.* 2001). Molekularer Wasserstoff wird an das aktive [NiFe]-Zentrum der RH gebunden und chemisch umgesetzt, was durch biochemische und spektroskopische Arbeiten belegt wurde (Pierik *et al.* 1998b, Bernhard *et al.* 2001). Ungeklärt ist noch, in wieweit ein H₂-Umsatz für die H₂-Sensierung erforderlich ist. Im Gegensatz dazu stehen die Mechanismen anderer metallhaltiger Gassensoren, bei denen das Substrat nur gebunden, aber nicht umgesetzt wird. Beispiele dafür sind der O₂-Sensor FixL von *Sinorhizobium meliloti* (Monson *et al.* 1992) und der CO-Sensor CooA von *Rhodospirillum rubrum* (Shelver *et al.* 1997). Ein weiterer Transkriptionsregulator ist das FNR-Protein (Fumarat-Nitratreduktase-Regulator) von *Escherichia coli*, welches die Expression vieler Gene des anaeroben Stoffwechsels in Abhängigkeit von Sauerstoff kontrolliert (Unden *et al.* 1995). Die Enzymausstattung der Zelle wird der Verfügbarkeit von O₂ angepasst. N-terminal trägt FNR ein FeS-Zentrum, das für die Sauerstofferkennung verantwortlich ist (Green *et al.* 1993, Khoroshilova *et al.* 1997).

Ein Modell der H₂-abhängigen Signaltransduktionskette, die die Hydrogenase-Genexpression in *R. eutropha* kontrolliert, ist in der Abbildung 32 dargestellt. Dabei bindet Wasserstoff an das [NiFe]-Zentrum des H₂-Sensors und wird heterolytisch gespalten, wobei ein Elektron vom [NiFe]-Zentrum über die FeS-Zentren hin zu einem vermuteten organischen redox-aktiven Kofaktor geleitet wird, von dem angenommen wurde, dass er in der Lage ist, zwei Elektronen aufzunehmen (Bernhard *et al.* 2001).

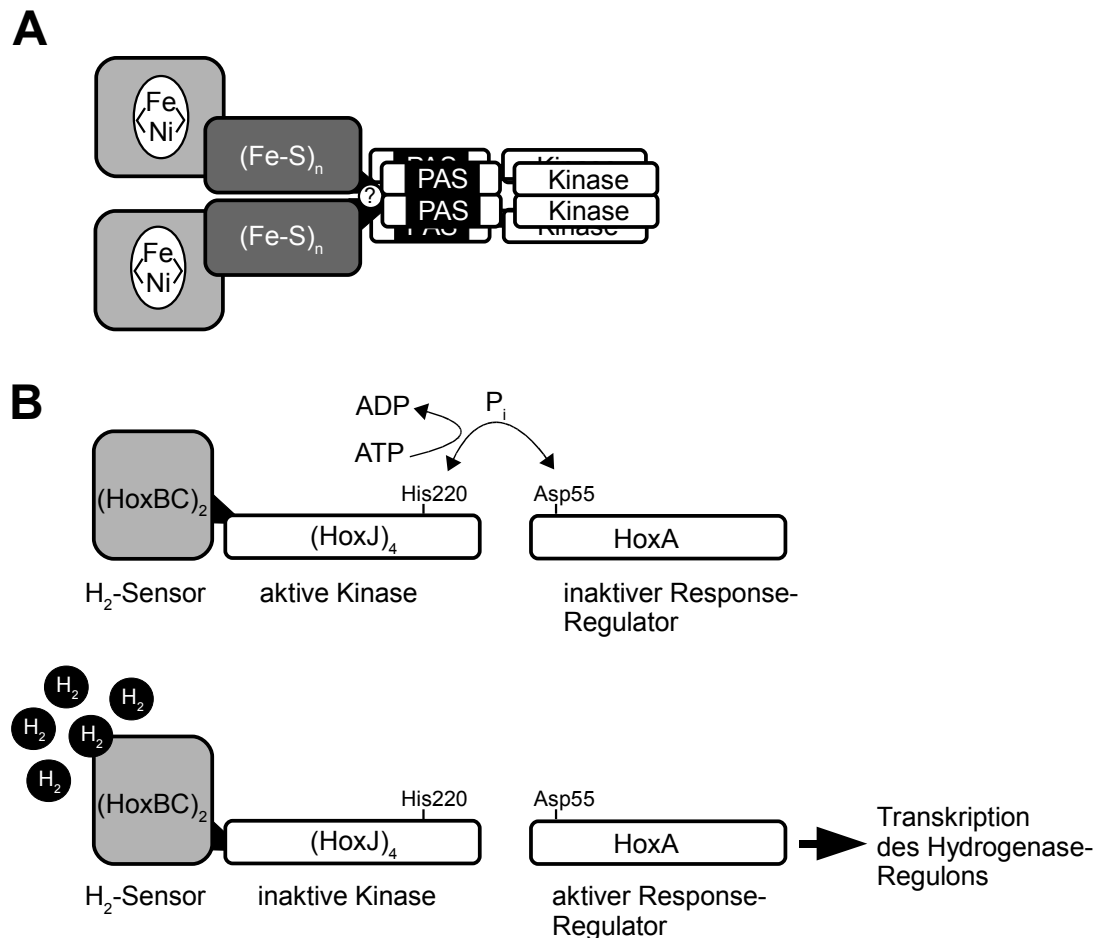


Abb. 32: Modell der H₂-abhängigen Signalübertragungsprozesse in *R. eutropha*.

(A) H₂-sensierender Komplex, bestehend aus einem Doppeldimer der RH und einem Tetramer der Histidin-Proteinkinase HoxJ. (B) Schematische Darstellung der H₂-Sensierung, die die Hydrogenase-Genexpression kontrolliert.

Da die RH in der Zelle als Doppeldimer vorliegt, wird wahrscheinlich von jedem der beiden [NiFe]-Zentren ein Elektron auf den in der kleinen Untereinheit HoxB vermuteten Redox-Kofaktor übertragen (Bernhard *et al.* 2001, Buhrke *et al.* 2004). Das Modell der Signalübertragung sieht weiterhin vor, dass von der RH ein Signal auf die PAS-Domäne in der Histidin-Proteinkinase HoxJ übertragen wird (Lenz *et al.* 2002). Experimentell konnte gezeigt werden (Buhrke *et al.* 2004), dass der die PAS-Domäne tragende N-Terminus von HoxJ mit der RH einen Komplex bildet (Abb. 32 A). PAS-Domänen tragen oft Redox-Kofaktoren und sind häufig an Signalübertragungsprozessen beteiligt. So enthält der O₂-Sensor FixL von *S. meliloti* in der N-terminalen PAS-Domäne einen Sauerstoff-bindenden Häm-Kofaktor (Gilles-Gonzalez *et al.* 1991) und das Aerotaxisprotein Aer von *E. coli* in seiner PAS-Domäne ein FAD (Bibikov *et al.* 2000). Analysen der Aminosäuresequenzen der Histidin-Proteinkinase HoxJ von *R. eutropha* und der HoxJ-Homologen HupT aus *Rhodobacter capsulatus* und *Bradyrhizobium japonicum* ergaben jedoch keinen offensichtlichen Hinweis auf ein mögliches

Bindemotiv für einen Kofaktor in den PAS-Domänen (Lenz & Friedrich 1998, Elsen et al. 2003). Offen bleibt weiterhin, ob und wie eine Elektronenübertragung zwischen RH und HoxJ erfolgt oder ob möglicherweise die Spaltung von Wasserstoff am aktiven Zentrum mit einer Konformationsänderung des gesamten Komplexes einhergeht, die die Kinase- bzw. Phosphatase-Aktivität von HoxJ beeinflusst.

4.1.1 Ungewöhnliche Strukturen und Kofaktoren im H₂-Sensor von *R. eutropha*

Die bisher bekannten H₂-Sensoren sind durch strukturelle Besonderheiten gekennzeichnet, die sie von den Standard-[NiFe]-Hydrogenasen unterscheiden. Ein Vergleich der Primärsequenzen der regulatorischen Hydrogenasen von *R. eutropha*, *Rh. capsulatus* und *B. japonicum* mit der Aminosäuresequenz der bereits kristallisierten [NiFe]-Hydrogenase von *D. gigas* zeigte drei konservierte Bereiche in den Sequenzen der Sensoren (N. Sträter und O. Lenz, persönliche Mitteilungen), die in Standard-[NiFe]-Hydrogenasen fehlen. Zwei der konservierten Motive befinden sich in der kleinen, eines in der großen Untereinheit (Abb. 15). Eine Modellierung ergab, dass das Motiv in der großen Untereinheit eine Schleife auf der Proteinoberfläche bildet. Die beiden Motive in der kleinen Untereinheit liegen in einer Ausrichtung (N. Sträter und O. Lenz, persönliche Mitteilungen). Einen dieser drei konservierten Sequenzbereiche bildet die C-terminale Extension der RH. Systematisches Deletieren der drei konservierten Bereiche in der RH von *R. eutropha* sollte zu Mutantenproteinen führen, die Aufschluss darüber geben, in wie weit die Motive (i) an der Interaktion mit der Histidin-Proteinkinase HoxJ, (ii) an der Dimerisierung der RH und (iii) an der Bindung eines möglichen Kofaktors beteiligt sind.

Das Entfernen der schleifenartigen Strukturen, sowohl in HoxC als auch in HoxB, führte zu einer Destabilisierung der RH. Es liegt nahe, dass die Mutantenproteine HoxC[ΔQ244-A268], HoxB[ΔQ155-L162] und HoxB[ΔQ155-L166] verstärkt der Proteolyse unterliegen. Aus vorangegangenen Arbeiten ist bekannt, dass ein erhöhter Abbau von HoxC gleichzeitig mit einem Abbau von HoxB einher geht (T. Buhrke, persönliche Mitteilung). Aussagen über die Beteiligung der drei Schleifen in der großen und kleinen Untereinheit der RH an der Dimerisierung, der Kofaktorbindung und an der Interaktion mit der Protein-Histidinkinase HoxJ konnten somit nicht getroffen werden. Die drei deletierten Motive sind offensichtlich essentiell für die strukturelle Integrität der RH.

Anders als bei der MBH von *R. eutropha* dient die C-terminale Extension der RH nicht der Membranverankerung (Bernhard *et al.* 2001). Der Austausch des Prolins an der Position 293 in HoxB gegen ein Stopp-Codon ermöglicht die Synthese eines so genannten RH_{Stopp}-Proteins, bei dem die C-terminale Extension entfernt ist (Buhrke *et al.* 2004). Dieses RH_{Stopp}-Protein wird stabil in der Zelle produziert und ist durch eine der Wildtyp-RH entsprechende H₂-oxidierende Aktivität gekennzeichnet. In immunologischen Tests lässt sich das Stopp-Protein nur als HoxBC-Dimer und nicht als (HoxBC)₂-Doppeldimer detektieren (Buhrke *et al.* 2004). Dieser Befund verdeutlicht, dass die C-terminale Extension von HoxB essentiell für die Ausbildung des HoxBC-Doppeldimers ist. Im Gegensatz zu dem RH-Wildtyp-Protein ist das RH_{Stopp}-Protein nicht in der Lage, H₂ zu sensieren, da eine Komplexbildung mit der Histidin-Proteinkinase HoxJ nicht mehr möglich ist (Buhrke *et al.* 2004).

Um der Frage nach der Signalübermittlung zwischen der regulatorischen Hydrogenase und der N-terminalen PAS-Domäne der Histidin-Proteinkinase HoxJ nachzugehen, war zunächst zu prüfen, ob ein organischer Redox-Kofaktor in diesen Prozess involviert ist. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit aufgenommenen UV-Vis-Spektren von gereinigter RH-*Strep*-tag und RH_{Stopp}-*Strep*-tag lassen die Vermutung zu, dass ein Kofaktor in der Nähe der kleinen Untereinheit der RH, genauer in der C-terminalen Extension, lokalisiert ist. Dem RH_{Stopp}-Protein fehlt diese Extension in HoxB und die UV-Vis-Spektren weisen darauf hin, dass diesem Protein auch der Kofaktor fehlt. Durch Denaturieren des RH-Proteins und anschließende „reversed phase“-Chromatographie sollte der Kofaktor schonend gereinigt und zur genaueren Identifizierung einer Massenspektroskopie unterzogen werden. Durch Letztere konnten jedoch keine erhärtenden Hinweise auf das Vorhandensein eines organischen Redox-Kofaktors gewonnen werden. Möglicherweise dissoziierte dieser bereits bei der Präparation des Komplexes ab oder er ließ sich nicht durch die Hitzefällung aus dem Proteingerüst herauslösen. Optische Untersuchungen am H₂-Sensor HupUV aus *Rh. capsulatus* deuten darauf hin, dass diese regulatorische [NiFe]-Hydrogenase keinen zusätzlichen redox-aktiven Kofaktor enthält (Elsen *et al.* 2003). Als Signalübertragung zwischen HupUV und der PAS-Domäne der Histidin-Proteinkinase HupT wird eine Konformationsänderung angenommen, die eine Schwächung der Interaktion zwischen HupUV und der PAS-Domäne in Gegenwart von H₂ bewirkt (Elsen *et al.* 2003). Allerdings sind bisher weder bei oxidierten noch bei reduzierten [NiFe]-Hydrogenasen großformatige Konformationsänderungen nachgewiesen worden (Higuchi *et al.* 1999,

Ogata *et al.* 2005, Volbeda *et al.* 2005). Für *R. eutropha* konnte eine H₂-abhängige Stabilisierung des RH-HoxJ-Komplexes nicht nachgewiesen werden (O. Lenz, persönliche Mitteilung).

Neuere spektroskopische Analysen mit gereinigten RH- und RH_{Stopp}-Proteinen von *R. eutropha* ergaben, dass sich in der RH ungewöhnliche FeS-Zentren befinden (Buhrke *et al.* 2005b). Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der kleinen Untereinheiten zwischen bekannten, bereits kristallisierten [NiFe]-Hydrogenasen und potentiellen H₂-Sensoren zeigt jedoch, dass die die FeS-Zentren koordinierenden Cystein- und Histidinreste, sowohl in den H₂-Sensoren als auch in den Standard-Hydrogenasen hoch konserviert sind (Albracht 1994, Higuchi *et al.* 1999, Matias *et al.* 2001, Volbeda *et al.* 2005). Es wurde daher angenommen, dass auch die kleine Untereinheit der regulatorischen Hydrogenase aus *R. eutropha* drei [4Fe-4S]-Zentren trägt (Kleihues *et al.* 2000). Eisen-Bestimmungen an gereinigtem RH-Protein von *R. eutropha* ergaben 7.6 Fe-Atome pro Nickelatom (Bernhard *et al.* 2001). Im Gegensatz dazu wurde Standard-[NiFe]-Hydrogenasen ein Fe/Ni-Verhältnis von elf bis zwölf zu eins bestimmt (Fischer *et al.* 1996). In einer anderen Arbeit vorgestellte Fe-XAS-Messungen an gereinigtem RH-Protein ergaben keinen Hinweis auf das Vorhandensein von [4Fe-4S]- bzw. [3Fe-4S]-Zentren im H₂-Sensor (Buhrke *et al.* 2005b). Favorisiert wurden stattdessen zwei [2Fe-2S]-Zentren und ein [4Fe-3S-3O]-Zentrum. Metallgehaltsbestimmungen und XAS-Analysen an der Fe-Kante deuten darauf hin, dass die Wildtyp-RH ein FeS-Zentrum mehr enthält als das um die C-terminale Extension verkürzte RH_{Stopp}-Protein (Buhrke *et al.* 2005b). Die Reaktion eines [4Fe-4S]-Zentrums in Gegenwart von Sauerstoff oder H₂O zu einem [4Fe-3S-3O]-Zentrum (Rousset *et al.* 1998) ist auch für den unter aeroben Bedingungen arbeitenden H₂-Sensor von *R. eutropha* nicht auszuschließen (Buhrke *et al.* 2005b). Während für die [NiFe]-Hydrogenase von *D. desulfuricans* bereits ein proximaler [4Fe-3S-3O]-Cluster beschrieben wurde (Matias *et al.* 2001), war ein solches FeS-Zentrum in dem RH_{Stopp}-Protein von *R. eutropha* nicht nachzuweisen. Möglicherweise enthält ein HoxBC-Doppeldimer ein [4Fe-3S-3O]-Zentrum, welches durch Aminosäurereste aus zwei HoxB-Untereinheiten koordiniert wird.

In Standard-[NiFe]-Hydrogenasen führt die H₂-Spaltung am aktiven Zentrum zu einer Reduktion der FeS-Cluster, die sich in der EPR-Spektroskopie verfolgen lässt (Albracht 1994, Cammack *et al.* 1997, Cammack *et al.* 2001). Eine solche Reduktion der FeS-Cluster konnte in der RH von *R. eutropha* nicht detektiert werden (Bernhard *et al.* 2001). Ursprünglich wurde angenommen, dass der vermutete redox-aktive

Kofaktor in der C-terminalen Extension von HoxB reduziert wird (Bernhard *et al.* 2001, Buhrke *et al.* 2004). Detailliertere UV-Vis-spektroskopische Untersuchungen geben jedoch Hinweise darauf, dass bei der Reduktion der RH mit H_2 wahrscheinlich ein FeS-Zentrum reduziert wird (Buhrke *et al.* 2005b). Die im UV-Vis-Spektrophotometer aufgezeichneten Signale können demzufolge einem $[4Fe-3S-3O]$ -Zentrum zugeordnet werden. Es ist bekannt, dass diese Zentren in vier Oxidationsstufen vorliegen können (Arendsen *et al.* 1998). Im doppelt reduzierten Zustand geben sie kein EPR-Signal, zeigen jedoch im UV-Vis-Spektrum ein Maximum bei 400 nm (Wolfe *et al.* 2002).

4.2 Das katalytische Zentrum des H_2 -Sensors

4.2.1 Ligandierung des Nickels in der RH

Die regulatorische Hydrogenase von *R. eutropha* kann in zwei Redox-Zuständen vorliegen. Zum einen existiert sie in der luftoxidierten Form („as isolated“) und zum anderen in der reduzierten Form, die dann entsteht, wenn die RH mit H_2 begast wird. Im EPR-Spektrum zeigt die reduzierte Form ein typisches Signal, das dem von paramagnetischem Ni-C vergleichbar ist (Pierik *et al.* 1998b, Bernhard *et al.* 2001, Haumann *et al.* 2003). Die Bindung des Ni-Atoms im aktiven Zentrum erfolgt durch Thiolgruppen von vier hoch konservierten Cysteinen aus der Proteinumgebung der großen Hydrogenase-Untereinheit. Die Koordinierung des Nickels in dem $[NiFe]$ -Zentrum ist interessant im Hinblick auf die besonderen katalytischen Eigenschaften der RH. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt stehen noch keine Hydrogenasekristalle von aeroben Mikroorganismen zur Verfügung, deren Daten die Erstellung eines atomaren 3D-Modells ermöglichen. Mit Hilfe der Röntgenabsorptionsspektroskopie lassen sich aber bereits jetzt schon Aussagen über die Nachbaratome des Nickels im katalytischen Zentrum treffen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden große Mengen des RH- und RH_{Stopp} -Proteins gereinigt und erstmalig für XAS-Analysen zur Verfügung gestellt. Experimentell ließen sich strukturelle Veränderungen am Ni-Atom der RH während der Bildung des Ni-C-Zustands feststellen, wie sie bei O_2 -sensitiven $[NiFe]$ -Hydrogenasen nicht gefunden wurden und die wahrscheinlich auch eine Ursache für die Unempfindlichkeit des H_2 -Sensors von *R. eutropha* gegenüber O_2 ist. Diese Veränderungen sind in der Abbildung 33 schematisch dargestellt.

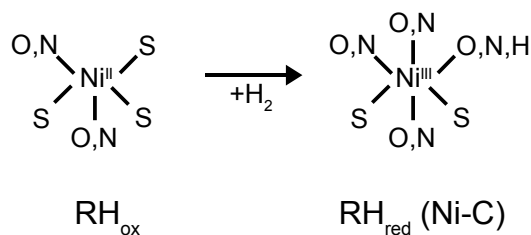


Abb. 33: Koordination des Ni in der oxidierten und reduzierten RH als Ergebnis von XAS-Analysen (Haumann *et al.* 2003). Die oxidierte Form der RH wurde durch Begasen mit H_2 in die reduzierte Form (Ni-C) überführt.

Mit Hilfe von Mutantenproteinen der RH und der löslichen NAD-reduzierenden [NiFe]-Hydrogenase (SH) von *R. eutropha* konnte bestätigt werden, dass nur drei der vier hoch konservierten Cysteine zum Ligandieren des Ni benötigt werden (Winter *et al.* 2004, Burgdorf *et al.* 2005b), wobei alle vier Cysteinreste zur Synthese eines katalytisch aktiven Enzyms notwendig sind (Burgdorf *et al.* 2005b). XAS-Studien an der RH weisen darauf hin, dass die Koordinierung des Nickelatoms durch weniger als vier Schwefel-Liganden oder eine Änderung in der Anzahl der S-Liganden nach dem Übergang in den Ni-C-Zustand oder auch eine Kombination beider Prozesse erfolgt (Haumann *et al.* 2003). Im oxidierten Zustand wird das Ni(II) in der RH durch drei S-Liganden gebunden. Beim Überführen der RH in den Ni-C-Zustand wird die Anzahl der S-Liganden um einen vermindert (Abb. 33), was durch Röntgenabsorptionsspektroskopie detektiert wurde (Haumann *et al.* 2003). Im Gegensatz dazu wird das Ni(II) in der SH von *R. eutropha* wahrscheinlich von zwei Thiol-Liganden gebunden, während sich erst durch eine lang andauernde Reduktion der SH die Anzahl der S-Liganden erhöht (Burgdorf *et al.* 2005b). Möglicherweise ist nur ein Teil der vier konservierten Cysteine in Abhängigkeit vom Oxidationsstatus des Proteins an der Nickelbindung beteiligt ist.

In der Hydrogenase von *Thiocapsa roseopersicina* und in der RH von *R. eutropha* wird Nickel im Ni-C-Status durch zwei S-Liganden gebunden (Maroney *et al.* 1991, Gu *et al.* 1996). Diese Nickelbindung im aktiven Zentrum der RH könnte für die physiologische Funktion des H_2 -Sensors bedeutend sein. Wie in der Abbildung 34 schematisch dargestellt, liegt im oxidierten Zustand Ni(II) fünffach koordiniert vor. Die Reduktion mit H_2 führt dann zur Bildung von sechsfach koordiniertem Ni(III). In beiden Zuständen beträgt die Anzahl der S-Liganden weniger als vier. Durch EPR-spektroskopische Analysen ist bekannt, dass das Eisenatom im [NiFe]-Zentrum nicht redox-aktiv ist (Pierik *et al.* 1998b, Bernhard *et al.* 2001). Im reduzierten Ni-C Zustand befindet sich zwischen den beiden Atomen Ni und Fe ein H-Ligand (Brecht *et al.* 2003).

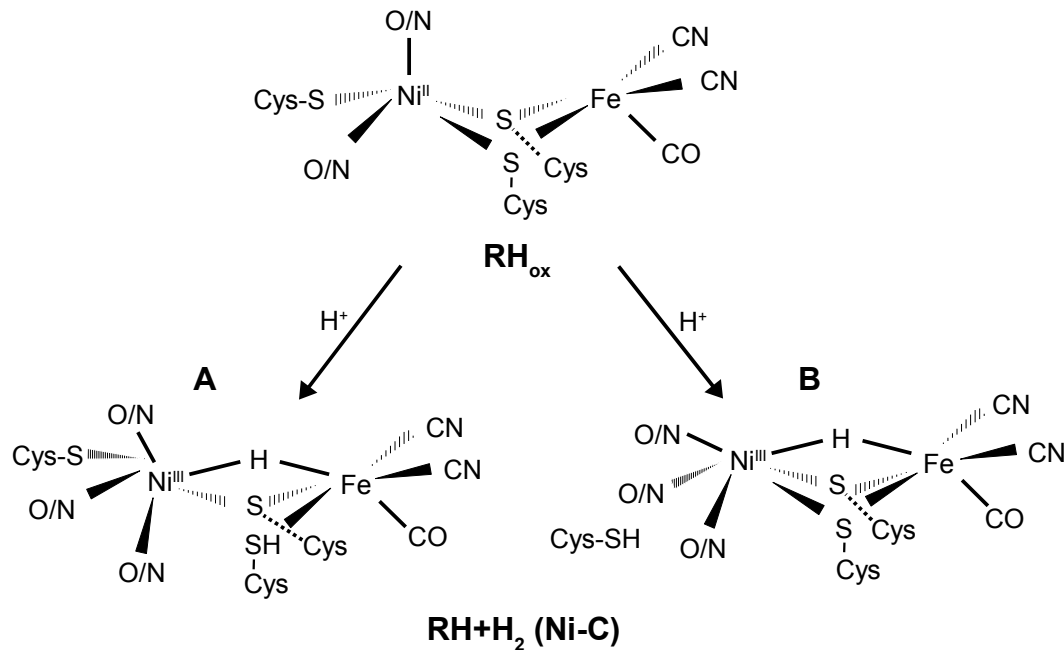


Abb. 34: Mögliche strukturelle Veränderungen am [NiFe]-Zentrum während der Reduktion des H_2 -Sensors von *R. eutropha* (Haumann *et al.* 2003).

Wird die RH im Ni-C-Zustand belichtet, erreicht sie den so genannten Ni-L-Zustand und verliert dabei vermutlich den Brückenliganden. Das Nickel würde dann im Oxidationsstatus Ni(I) vorliegen. Die XAS-Daten der RH deuten, anders als bei den Standard-[NiFe]-Hydrogenasen, auf eine die Hydridbindung begleitende Protonierung eines Brücken-Schwefels hin. Diese Protonierung führt wahrscheinlich zum Verlust der Koordinierung zwischen S und Ni (Haumann *et al.* 2003) und damit wiederum zur Abnahme der Anzahl der S-Liganden am Nickel (Abb. 34 A). Alternativ könnte auch parallel zur Hydridbindung zwischen Ni und Fe ein terminaler S-Ligand vom Ni entfernt und durch einen (O,N)-Liganden ersetzt werden (Abb. 34 B). In so genannten Standard-[NiFe]-Hydrogenasen, wie sie beispielsweise in *D. gigas*, *D. vulgaris* und *Allochrodatum vinosum* anzutreffen sind, wird das Ni(III) durch vier Thiol-Liganden koordiniert (Vignais & Colbeau 2004).

XAS-Studien an der mittels *Strep*-tag-Technologie aus *R. eutropha* isolierten großen RH-Untereinheit HoxC_{Strep} (Winter *et al.* 2005) haben ergeben, dass zwei Cysteinseitenketten das Fe koordinieren. Nach Einbau des Nickels in das Protein dienen diese Seitenketten als Brückenliganden zwischen den beiden Metallen in HoxC_{Strep} (Löscher *et al.* 2005). Die Struktur von HoxC_{Strep} scheint aber nicht mit der des nativen HoxC in der RH übereinzustimmen, da durch EPR-Spektroskopie an isoliertem HoxC_{Strep} kein Ni-C Signal detektiert werden konnte. Fe-XAS-Analysen haben gezeigt, dass am Fe keine O-Liganden vorhanden sind (Löscher *et al.* 2005). Daraus lässt sich

schlussfolgern, dass dem HoxC_{Strep}-Protein der verbrückende O-Ligand fehlt, dessen Existenz im oxidierten Zustand von Standard-[NiFe]-Hydrogenasen angenommen wird. Stattdessen befindet sich am Nickel des aktiven Zentrums der RH wahrscheinlich ein terminaler O-Ligand, der sich im nativen Protein nicht nachweisen ließ (Haumann et al. 2003).

Für die SH von *R. eutropha* konnte kein Ni-C detektiert werden. Dieser Zustand tritt bei der H₂-Spaltung durch die SH offenbar nicht auf (Burgdorf et al. 2005b). Das aktive Zentrum der SH weist nicht die Standardstruktur (CysS)₂Ni^{II}(μ-CysS)₂Fe^{II}(CN)₂(CO) auf. Aus den kombinierten Daten von XAS, EPR- und FTIR-Spektroskopie wurde folgendes Modell für das [NiFe]-Zentrum der SH erstellt: (CN (O)₃Ni^{II}(μ-CysS)₂Fe^{II}(CN)₃(CO) (Burgdorf et al. 2005b).

4.2.2 Die Funktion konservierter Aminosäuren in HoxC

4.2.2.1 Charakteristische Sequenzmotive bestimmen die besonderen katalytischen Eigenschaften der RH

Ein Vergleich von Aminosäuresequenzen verschiedener [NiFe]-Hydrogenasen ergab die Präsenz von sechs konservierten Motiven in den großen Hydrogenase-Untereinheiten (Albracht 1994, Voordouw 1992, Burgdorf et al. 2002). Der Abgleich der Aminosäuresequenzen der H₂-Sensoren von *R. eutropha*, *Rh. capsulatus* und *B. japonicum* zeigte, dass die Zusammensetzung der sechs konservierten Motive in der Nähe des aktiven Zentrums von den Motiven der energiekonservierenden [NiFe]-Hydrogenasen abweicht (Abb. 22). Die Unterschiede in der Proteinumgebung gelten als eine Ursache für die unterschiedlichen biochemischen und spektroskopischen Eigenschaften der H₂-Sensoren. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss eines gezielten Austauschs von einzelnen Aminosäuren auf die katalytischen Eigenschaften und das spektroskopische Verhalten der RH von *R. eutropha* untersucht.

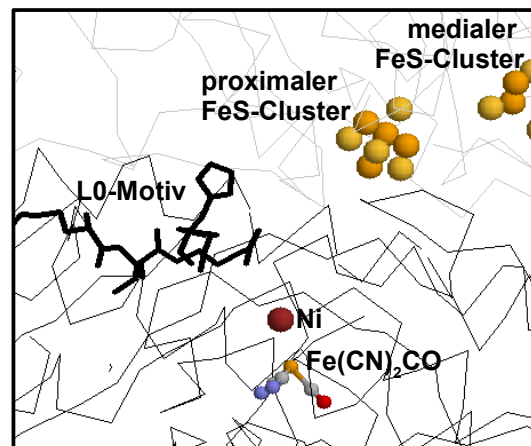


Abb. 35: Detailansicht der Kristallstruktur der [NiFe]-Hydrogenase von *D. gigas* (Volbeda *et al.* 1995). Die Koordinaten wurden der Brookhaven Protein Datenbank entnommen (2frv). Das Kohlenstoffgerüst der großen Untereinheit ist dunkelgrau, das der kleinen Untereinheit hellgrau dargestellt. Die Aminosäuren des L0-Motivs sind schwarz hervorgehoben. Das [NiFe]-Zentrum, die distalen Fe-Liganden und die FeS-Zentren sind als Kugeln abgebildet.

Die Aminosäure-Austausche erfolgten in den Motiven L0 (RIEGH) und L4 (Gx₄PRGx₃H) der großen Untereinheit der RH von *R. eutropha*. In Analogie zur bereits bekannten Kristallstruktur der *D. gigas* [NiFe]-Hydrogenase (Volbeda *et al.* 1995) befindet sich in der RH das L0-Motiv an der Kontaktstelle zwischen großer und kleiner Hydrogenase-Untereinheit (Abb. 35). Das führt zu der Annahme, dass die Aminosäuren an Interaktionen zwischen beiden Untereinheiten beteiligt sind. Im L0-Motiv von Standard-Hydrogenasen befindet sich ein Isoleucin, welches durch Valin in den H₂-Sensoren ersetzt ist. Weiterhin steht an Stelle des Histidins ein Aspartat in den regulatorischen Hydrogenasen (Kleihues *et al.* 2000). Durch ortsgerichtete Mutagenese wurde das Valin an der Position 12 in HoxC gegen die Aminosäuren Alanin bzw. Isoleucin getauscht. Die H₂-oxidierende Aktivität der Mutantenproteine sank dadurch um ca. 20 bzw. 30 % ab, verglichen mit der Aktivität des Wildtyp-Proteins. Die regulatorische Aktivität, gemessen als Aktivität der β -Galaktosidase, verminderte sich ebenfalls. Die Stabilität des Proteins wurde durch die Austausch von Val \rightarrow Ala bzw. Val \rightarrow Ile nicht beeinträchtigt. Im Vergleich zur Wildtyp-Aktivität verdoppelte sich die D₂/H⁺-Austauschaktivität der V12I-Mutante und es konnte HD als Zwischenprodukt der Isotopenkonversion gemessen werden. Eine solche HD-Produktion ließ sich bisher für das Wildtyp-Protein nicht nachweisen (Bernhard *et al.* 2001). Dies deutet darauf hin, dass der Austausch von D₂ zwischen aktiven Zentrum und der Umgebung eingeschränkt ist und eine Art molekularer Käfig gebildet wird (Krasna 1979). In ihm reagiert das Intermediat HD weiter zu H₂, noch bevor HD durch das Enzym an die Proteinoberfläche diffundieren kann (Bernhard *et al.* 2001). Das V12I-Mutantenprotein ist die erste RH-Variante von *R. eutropha*, bei der HD detektiert wurde. Die D₂-Diffusion

vom und in das [NiFe]-Zentrum ist in diesem Mutantenprotein offensichtlich nicht eingeschränkt und HD gelangt bis an die Proteinoberfläche. Standard-[NiFe]-Hydrogenasen setzen im Gegensatz dazu bei der D_2/H^+ -Austauschreaktion vornehmlich das Zwischenprodukt HD frei. Auch für den H_2 -Sensor HupUV aus *Rh. capsulatus* wurde die Freisetzung von HD als Intermediat im D_2/H^+ -Austausch beschrieben (Vignais *et al.* 2000).

Wie der H_2 -Sensor von *R. eutropha*, ist die membrangebundene [NiFe]-Hydrogenase von *Azotobacter vinelandii* ebenfalls nicht in der Lage, das Zwischenprodukt HD zu bilden (McTavish *et al.* 1996). Als mögliche Ursache für dieses kinetische Verhalten wurde eine erschwerte Reduktion von Protonen vorgeschlagen, deren Ursache im Redox-Milieu vermutet wird (McTavish *et al.* 1996). Wahrscheinlicher aber ist, dass nicht die Diffusion von H_2 der reaktionslimitierende Faktor der D_2/H^+ -Austauschreaktion ist, sondern der Elektronentransfer im Protein (Bertrand *et al.* 2000). Auch die D_2/H^+ -Austauschreaktion der RH wird scheinbar durch die Geschwindigkeit der Elektronenübertragung limitiert. Untersuchungen an einer um die C-terminale Extension verkürzten Version der RH (RH_{Stopp}) ergaben, dass dieses Protein eine um 32 % höhere Isotopenaustausch-Aktivität zeigte als die Wildtyp-RH (Buhrke 2002). Durch das Entfernen der C-terminalen Verlängerung in der RH_{Stopp} geht möglicherweise eine redox-aktive Komponente verloren, womit der Elektronenfluss im Protein verändert wird. Ein Modell der D_2/H^+ -Austauschreaktion in der RH kann wie folgt postuliert werden: D_2 diffundiert zum aktiven Zentrum, an dem die heterolytische Spaltung erfolgt. Ein freiwerdendes Elektron wird sehr schnell auf das distale FeS-Zentrum übertragen und, anders als in Standard-Hydrogenasen, verbleibt es dort. In der Zwischenzeit erfolgt ein mehrmaliger Austausch von Protonen zwischen aktivem Zentrum und Proteinoberfläche über den Protonenkanal. Fließt das Elektron vom distalen FeS-Cluster wieder zurück zum aktiven Zentrum, wird H_2 freigesetzt. Der Elektronenfluss und die damit verbundene Freisetzung von H_2 scheinen reaktionslimitierend zu sein. Das Intermediat HD reagiert weiter zu H_2 , noch bevor HD an die Proteinoberfläche diffundiert (Bernhard *et al.* 2001).

Nach dem Austausch Val→Ile an der Position 12 in HoxC liegt im Sensor eine Aminosäure-Sequenz vor, wie sie auch in energieliefernden Hydrogenasen auftritt. Möglicherweise ist damit die erhöhte D_2/H^+ -Austausch-Aktivität und das Auftreten von HD als Zwischenprodukt zu erklären. Eine andere mögliche Ursache für die Bildung von HD kann in der Beschaffenheit der Proteinprobe liegen. Im FTIR-Spektrum sind IR-Absorptionen detektiert worden, die denen der Wildtyp-RH entsprechen, die aber

nicht homogen sind. Im Bereich des Spektrums um die Wellenzahl 1943 cm^{-1} , in dem das Absorptionsmaximum des CO-Liganden liegt, überlappen sich drei Banden. Alle drei Banden verschieben sich zur höheren Frequenz, wenn die Probe mit H_2 reduziert wird. Das bedeutet, dass das aktive Zentrum im Protein der V12I-Mutante in verschiedenen Konformationen vorliegt. In der EPR-Spektroskopie wurde für das V12I-Mutantenprotein Ni-C mit vier g-Faktoren detektiert. Das Ni-C des Wildtyp-Proteins ist dagegen durch drei g-Faktoren charakterisiert. Die sich im FTIR-Spektrum überlappenden Banden in der CO-Region und die verschiedenen paramagnetischen Zustände des Ni in dem funktionellen V12I-Mutantenprotein weisen auf eine heterogene Proteinstruktur hin. Künftig soll die Reinigung des V12I-Mutantenproteins mit Hilfe eines *Strep*-tags möglich sein, um durch anschließende XAS-Analysen das aktive Zentrum näher zu charakterisieren.

4.2.2.2 H_2 -Bindung ist nicht ausreichend für die H_2 -Sensierung

Die *para*- H_2 -/*ortho*- H_2 -Konversion beruht auf einer reversiblen Bindung von *ortho*- H_2 am katalytischen Zentrum und einer Kernspin-Konversion. Dabei entsteht ein Gemisch der H_2 -Spezies (Cammack *et al.* 1994). Protonen aus dem das Protein umgebenden Wasser haben keinen Einfluss auf diese Teilreaktion. Defekte am Protonenkanal, die nicht in direkter Nachbarschaft zum aktiven Zentrum liegen, sollten ebenfalls keinen Einfluss auf die *para*- H_2 -/*ortho*- H_2 -Konversionsaktivität haben. Der Austausch des Glu13 in HoxC von *R. eutropha* gegen Lys und Gln führte zum vollständigen Verlust der H_2 -oxidierenden und der H_2 -sensierenden Aktivität. Das HoxC[E13Q]-Protein zeigte im Konversionstest eine Bindung von H_2 , die allerdings im Vergleich zum Wildtyp-Protein deutlich reduziert war. Diese Tatsache deutet darauf hin, dass das Glu13 im H_2 -Sensor von *R. eutropha* an der Bindung und Spaltung von H_2 beteiligt ist.

Das dem Glu13 aus *R. eutropha* entsprechende konservierte Glu18 im L0-Motiv der [NiFe]-Hydrogenase von *D. gigas* ist vermutlich in den Transfer von Protonen zwischen dem aktiven Zentrum und dessen Proteinumgebung involviert, indem eine Carboxylgruppe des Glu18 eine Wasserstoffbrücke mit dem terminalen Cysteinrest ausbildet (Garcin *et al.* 1999, Fontecilla-Camps *et al.* 2001, Matias *et al.* 2001). In *D. fructosovorans* wird für das korrespondierende Glu25 im L0-Motiv der [NiFe]-Hydrogenase die Stabilisierung eines Wassermoleküls postuliert, das dann während der Enzymaktivierung vom aktiven Zentrum entlassen wird (Stadler *et al.* 2002). Der Austausch von Glu25→Gln in *D. fructosovorans* unterdrückt zwar den schnellen Protonentransfer vom aktiven [NiFe]-Zentrum, beeinflusst aber nicht die H_2 -Spaltung (de Lacey *et al.* 2003).

Die D_2/H^+ -Austausch-Aktivität im E13Q-Mutantenprotein von *R. eutropha* ist vollständig verloren gegangen und es ließ sich in der EPR-Spektroskopie kein Ni-C-typisches Signal detektieren. Die FTIR-Spektren der HoxC[E13Q]- und HoxC[E13L]-Austauschmutanten zeigten ein identisches Bandenmuster für die Absorptionsmaxima der diatomaren CN^- - und CO -Liganden des Eisens. Allerdings zeigte sich in der für die CO -Absorption typischen Region um 1943 cm^{-1} eine Überlagerung zweier Zustände, die im Vergleich zur entsprechenden Bande der Wildtyp-RH, zur höheren Frequenz verschoben war. Eine Reduktion der Glu13-Mutantenproteine hatte dagegen keinen Einfluss auf die FTIR-Spektren, was bestätigt, dass die Mutanten vollständig inaktiv sind.

Die Ergebnisse für die HoxC(E13)-Austauschmutanten sind vergleichbar mit denen, die in früheren Studien an der NAD-reduzierenden löslichen Hydrogenase von *R. eutropha* gezeigt wurden (Burgdorf *et al.* 2002). Ein Austausch des korrespondierenden Glu14 durch Gln bzw. Val im L0-Motiv von HoxH, der katalytischen Untereinheit der SH, führte zu einem vollständigen Verlust der H_2 -oxidierenden und der D_2/H^+ -Austausch-Aktivität. Beide Mutanten waren nicht mehr in der Lage, mit H_2 als alleiniger Energiequelle zu wachsen (Burgdorf *et al.* 2002). Der Austausch des konservierten Glu an der Position 14 in HoxH wirkte sich negativ auf die Konformation und die Stabilität des SH-Proteins aus (Burgdorf *et al.* 2002). Dagegen haben die E13Q/L-Austausche in HoxC keinen Einfluss auf die Stabilität des RH-Oligomers. Die Substitution des konservierten Glu13 durch Gln in HoxC führt zur Unterbrechung des für das aktive RH-Protein essentiellen Protonentransfers. Diese Unterbrechung und das Fehlen des Ni-C-Signals bei beiden Glu13-Mutantenproteinen, deutet auf die Notwendigkeit von H_2 -Spaltung und Protonentransfer für die H_2 -Sensierung hin. Allein die H_2 -Bindung reicht für die H_2 -Sensierung offenbar nicht aus.

4.2.2.3 Sauerstofftoleranz des H_2 -sensierenden Komplexes

Die Aminosäure Asp15 im L0-Motiv der großen Untereinheit der H_2 -Sensoren ist streng konserviert. In energieliefernden [NiFe]-Hydrogenasen befindet sich an der Stelle dieses Aspartats ein Histidin. Der Austausch des Restes D15 in HoxC gegen His und Leu führte zu einer Störung der Oligomerisation der RH zur $(HoxBC)_2$ -Form. Die kleine Untereinheit des D15L-Mutantenproteins unterliegt einer schnellen Proteolyse in der Zelle. Die H_2 -oxidierenden Aktivitäten der D15-Mutanten sind nahezu verloren gegangen, wohingegen die D_2/H^+ -Austausch-Aktivitäten und die regulatorischen Aktivitäten nur wenig beeinflusst sind. Die niedrige H_2 -oxidierende Aktivität des HoxC[D15H]-Proteins korreliert mit einer erhöhten O_2 -Toleranz des regulatorischen

Systems beim Wachstum mit H_2 und CO_2 . Während der auf H_2 reagierende Wildtyp-Stamm keine O_2 -Konzentrationen über 5 % toleriert, können die HoxC[D15H]-Mutantenzellen noch mit 10 % O_2 in der Gasatmosphäre lithoautotroph wachsen. Auch andere auf H_2 -reagierende *R. eutropha* HF433-Derivate sind nicht in der Lage, hohe O_2 -Konzentrationen zu tolerieren (Lenz & Friedrich 1998). Der Unterschied zwischen dem Wildtyp *R. eutropha* H16 und *R. eutropha* HF433 besteht in der unterschiedlichen Aktivität der Histidin-Proteinkinase HoxJ (Lenz & Friedrich 1998). Die H_2 -Signalübertragung in HF433-Derivaten scheint demnach O_2 -empfindlich zu sein. Die Katalyse der Wildtyp-RH ist in Folge einer behinderten O_2 -Diffusion durch einen verengten Gaskanal zum aktiven Zentrum O_2 -tolerant (Buhrke et al. 2005a).

Die Daten aus der FTIR und EPR-Spektroskopie stimmen für die D15H-Mutante und die Wildtyp-RH weitgehend überein. Vergleichbare Untersuchungen an Mutantenproteinen der löslichen Hydrogenase aus *R. eutropha* zeigten ähnliche Ergebnisse (Burgdorf et al. 2002). So wies das durch den Austausch des His16 im L0-Motiv von HoxH gegen Leucin entstandene SH-Oligomer keine H_2 -Oxidoreduktase-Aktivität mehr auf, die D_2/H^+ -Austausch-Aktivität blieb jedoch unbeeinflusst (Burgdorf et al. 2002). Die Ergebnisse für die D15H-Mutante und die, die für den analogen Austausch in HoxH von *R. eutropha* beschrieben wurden, deuten auf eine wichtige Rolle dieses Aminosäurerestes im Elektronenfluss vom aktiven [NiFe]-Zentrum zum proximalen FeS-Zentrum hin.

Die Sensierung von H_2 erfordert eine Komplexbildung zwischen der RH und der Kinase HoxJ. Entsprechend dem gegenwärtig existierenden Modell (Lenz & Friedrich 1998, Lenz et al. 2002) steuert die H_2 -abhängige Signalweiterleitung die Phosphorylierungsaktivität der Kinase und schließlich die Phosphorylierung des Response-Regulators HoxA, der in seiner nicht-phosphorylierten Form die Transkription der SH- und der MBH-Gene aktiviert. In Stämmen mit inaktivem HoxJ-Protein unterliegt die Transkription der Hydrogenasegene nicht mehr der Kontrolle durch H_2 und wird gleichzeitig insensitiv gegenüber O_2 . Ähnliche Effekte von Mutationen in homologen Histidinkinasen, die an der H_2 -Sensierung beteiligt sind, wurden für *Rh. capsulatus* und *B. japonicum* beschrieben (Elsen et al. 1993, Van Soom et al. 1999). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass der D15H-Austausch in HoxC der RH zu einer H_2 -abhängigen, aber O_2 -toleranteren Hydrogenase-Gentranskription führte. Da O_2 keinen Effekt auf den Autophosphorylierungsstatus von HoxJ (O. Lenz, persönliche Mitteilung) oder die H_2 -Spaltung am aktiven Zentrum hat (Bernhard et al. 2001, Buhrke et al. 2004, Buhrke et al. 2005a), ist zu vermuten, dass er den intramolekularen

Elektronentransfer oder die nachfolgende Signalübertragung auf die Input-Domäne der Kinase HoxJ oder beides beeinflusst. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass O₂ und freie Elektronen die FeS-Cluster degenerieren und folglich ein normaler Elektronenfluss nicht mehr stattfinden kann. Möglicherweise wird auch die Maturation der RH durch O₂ beeinflusst.

In dem Stamm *R. eutropha* HF433 wurde durch eine Punktmutation Glycin-zu-Serin rekonstituiert und somit die Funktionslosigkeit von HoxJ aufgehoben (Lenz & Friedrich 1998). In diesen Stamm ließ sich durch homologe Rekombination der D15H-Austausch in HoxC einfügen. Der resultierende *R. eutropha*-Stamm HF657 wurde zur Isolierung einer O₂-insensitiven RH genutzt, mit deren Hilfe erstmals die H₂-abhängige Phosphorylierung des HoxBCJ-Komplexes unter aeroben Bedingungen *in vitro* gezeigt werden konnte (O. Lenz, persönliche Mitteilung). Der im Experiment verwendete Protein-Komplex wurde mit Hilfe eines His-tags aus *R. eutropha* isoliert.

4.2.2.4 Die H₂-Sensierung erfolgt unabhängig vom H₂-Umsatz

Wie im vorangegangenen Kapitel beschrieben, ist die D₂/H⁺-Aktivität des HoxC[D15H]-Proteins vergleichbar mit der des Wildtyps, während die H₂-oxidierende Aktivität sehr niedrig ist. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das Mutantenprotein H₂ noch katalytisch spaltet und das Hydrid in der Brückenposition zwischen Ni und Fe gebildet wird, was sich in der EPR-Spektroskopie als Ni-C-Signal detektieren lässt. Der Protonentransfer ist nicht beeinträchtigt, was aus der hohen D₂/H⁺-Austauschaktivität abgeleitet wird. Die niedrige H₂-oxidierende Aktivität deutet darauf hin, dass im HoxC[D15H]-Mutantenprotein der Elektronenfluss über die FeS-Zentren in HoxB stark vermindert ist. Da die H₂-sensierende Aktivität nicht beeinträchtigt ist, scheint der H₂-Umsatz für die Signalübermittlung nicht notwendig zu sein.

Die Interaktion zwischen der RH und der Histidin-Proteinkinase HoxJ ist abhängig von der C-terminalen Extension von HoxB und der N-terminalen „Input“-Domäne in HoxJ (Buhrke et al. 2004, Burgdorf *et al.* 2005a). Es ist anzunehmen, dass die Reduktion der FeS-Cluster oder eines noch nicht identifizierten Kofaktors oder auch beider von einer Konformationsänderung des H₂-Sensors begleitet wird. Dadurch erfolgt eine Signalweiterleitung an HoxJ, was wiederum zur Kontrolle der Kinase-Aktivität der Transmitter-Domäne führt. Die H₂-Sensierung erfolgt demnach unabhängig vom H₂-Umsatz.

4.2.3 Beteiligung der Aminosäure R411 in HoxC an der Bindung bzw. Stabilisierung eines Brückenliganden

[NiFe]-Hydrogenasen enthalten neben den Liganden des [NiFe]-Zentrums noch eine Vielzahl an konservierten Aminosäuren, deren Funktion nicht bekannt ist. Die große Untereinheit des H₂-Sensors von *R. eutropha* enthält im L4-Motiv ein hoch konserviertes Arginin. In den bereits in kristallisierter Form untersuchten [NiFe]-Hydrogenasen liegt dieser Rest (Arg463 in *D. gigas*) nahe am aktiven Zentrum. In früheren Arbeiten wurde davon ausgegangen, dass die H₂-Spaltung am Eisen-Atom stattfindet (Pavlov *et al.* 1998, De Gioia *et al.* 1999b, Pavlov *et al.* 1999, De Gioia *et al.* 1999a). Aus der Kristallstruktur der Hydrogenase von *D. gigas* geht hervor, dass das Fe durch das Arg463 bedeckt wird. Wahrscheinlich bewirkt dieser Aminosäurerest eine Stabilisierung des Brückenliganden zwischen Ni und Fe (Stein & Lubitz 2004). Das aktive Zentrum der Standard-[NiFe]-Hydrogenasen wird von vier Cysteinresten kovalent gebunden. Interaktionen zwischen der Proteinumgebung und dem aktiven Zentrum finden möglicherweise durch die Bildung von Wasserstoffbrücken statt. Drei Aminosäuren, die eine enge Wechselwirkung mit dem aktiven Zentrum eingehen können, sind das His72, Ser486 und das schon erwähnte Arg463 (*D. gigas* Nummerierung). Wie oben beschrieben, befindet sich das basische His72 im L2-Motiv der großen Untereinheit und ist nur in den energieliefernden [NiFe]-Hydrogenase konserviert. In den bekannten H₂-Sensoren befindet sich an dieser Position ein Glutamin. Das Serin an der Position 486 in *D. gigas* ist nicht konserviert. Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen von vier H₂-Sensoren und vier energieliefernden [NiFe]-Hydrogenasen ergab, dass an Stelle des Serins 486 in den H₂-Sensoren und den energieliefernden Hydrogenasen ein Threonin konserviert ist. Wegen des gleichen chemischen Charakters von Serin und Threonin ist eine unveränderte Funktion innerhalb des Proteins anzunehmen. Das Arg463 ist in allen [NiFe]-Hydrogenasen hoch konserviert und ist Bestandteil des L4-Motivs. In einem von M. Stein (2001) für die [NiFe]-Hydrogenase von *D. gigas* postulierten Katalysemechanismus ist das His72 in der Lage, eine Wasserstoffbrücke zu dem seinerseits Ni und Fe verbrückenden Cys533 zu bilden. Die drei diatomaren Fe-Liganden im aktiven Zentrum sind zum Ausbilden von Wasserstoffbrücken fähig. Aus FTIR-spektroskopischen Untersuchungen ist bekannt, dass es sich dabei in Standard-[NiFe]-Hydrogenasen um zwei CN⁻- und einen CO-Liganden handelt (Happe *et al.* 1997, De Lacey *et al.* 1997, Pierik *et al.* 1999). An Hand der verfügbaren Kristallstruktur ist ersichtlich, dass die zwei diatomaren CN⁻-Liganden in unmittelbarer Nachbarschaft zu polaren Aminosäuren liegen, wohingegen der dritte Ligand in eine unpolare Tasche hineinragt. Wahrscheinlich würden die beiden Cyanide

eher eine Wasserstoffbrücke mit der Proteinumgebung bilden als das CO, welches in die unpolare Tasche hineinragt (Volbeda *et al.* 1996, de Lacey *et al.* 1997). Räumlich bedeckt das Arg463 das aktive Zentrum und könnte an der Bildung einer oder mehrerer Wasserstoffbrückenbindungen zu einem der Cyanid-Liganden beteiligt sein. Wahrscheinlich ist auch, dass das Arg463 der Stabilisierung des verbrückenden OH-Liganden zwischen Ni und Fe im Ni-B-Zustand dient und somit in den Mechanismus der H₂-Spaltung integriert ist (Stein 2001).

Ein Modell des katalytischen Zentrums im Ni-B-Zustand ist in der Abbildung 36 A gezeigt. Wird der μ -Hydroxo-Ligand in der Ni-B-Form protoniert, so entsteht ein Wassermolekül, dass sich als Ligand zwischen dem paramagnetischen Ni und Fe befindet. Kommt das aktive Zentrum nun mit Wasserstoff in Kontakt, so geht die Ni-OH₂-Bindung verloren und H₂ kann an das aktive Zentrum diffundieren und gespalten werden. Ein Wasserstoffatom wird dabei zum Hydrid, das sich später in der Brückenposition zwischen Ni und Fe befindet (Stein 2001, Brecht *et al.* 2003). Zunächst geht dieses Hydrid eine Verbindung mit dem Eisenatom ein. Das zweite H-Atom wird temporär von dem terminalen Cys530 aufgenommen und dann auf ein Wassermolekül übertragen, wodurch ein Hydronium-Ion (H₃O⁺) entsteht. Das H₃O⁺ steht über Wasserstoffbrücken mit dem Arg463 und dem terminalen Cyanid in Verbindung und ist in der Lage, ein Proton abzugeben oder ganz vom aktiven Zentrum weg zu diffundieren.

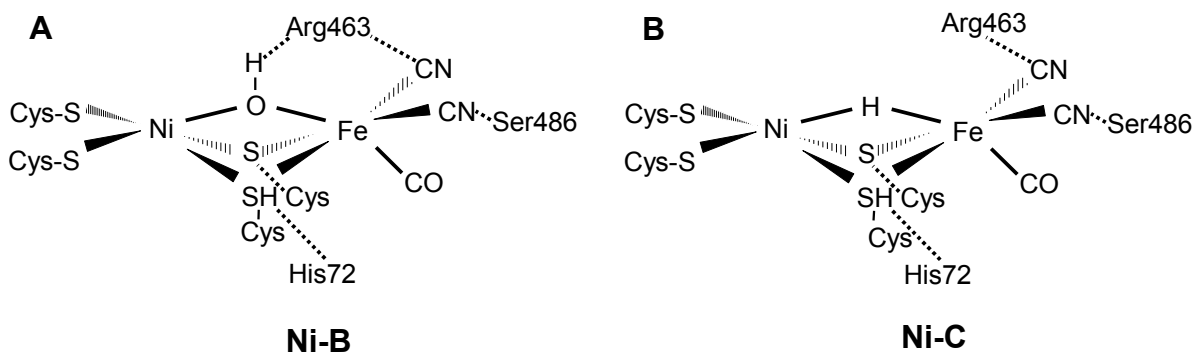


Abb. 36: Kalkulierte Zwischenstufen bei der heterolytischen Spaltung von H₂ durch die [NiFe]-Hydrogenase von *D. gigas* (nach M. Stein 2001). Dargestellt ist das aktive Zentrum mit seiner unmittelbaren Proteinumgebung.

Die Hydrogenase befindet sich nun im Ni-C-Zustand, der in der Abbildung 36 B skizziert ist (Stein 2001). Der Einfluss der Proteinumgebung auf den Katalysemechanismus besteht in der Koordination der protonierten Brückenliganden.

Für die RH von *R. eutropha* konnten die Zustände Ni-A und Ni-B bisher nicht beschrieben werden (Pierik *et al.* 1998b, Bernhard *et al.* 2001). Eine mögliche Ursache dafür kann die veränderte Proteinumgebung des aktiven Zentrums sein. Es wurde angenommen, dass eine Verengung des Gaskanals eine Inaktivierung des Enzyms durch O₂ verhindert und deshalb die Zustände Ni-A und Ni-B nicht existieren (Buhrke *et al.* 2005a). Die Erweiterung des Kanals durch ortsgerichtete Mutagenese führte zu einem RH-Derivat, dass durch O₂ inaktiviert werden konnte. Das Mutantenprotein zeigte Eigenschaften, die bisher nur für Standard-[NiFe]-Hydrogenasen beschrieben wurden (Buhrke *et al.* 2005a).

Durch ortsgerichtete Mutagenese des konservierten Arg411 im L4-Motiv von HoxC wurde untersucht, inwieweit dieser Aminosäurerest in den Mechanismus der H₂-Spaltung der regulatorischen Hydrogenase involviert ist. Das Arg411 wurde dabei gegen Lys bzw. Leu ausgetauscht. Die resultierenden Mutantenproteine sind durch den vollständigen Verlust sowohl der H₂-oxidierenden Aktivität als auch der D₂/H⁺-Austauschaktivität gekennzeichnet. Sie sind damit nicht mehr in der Lage, H₂ zu sensieren. Mit Hilfe einer nativen PAGE und anschließender Immunoblot-Analyse konnte jedoch gezeigt werden, dass dennoch eine Interaktion der Mutantenproteine mit der Histidin-Proteinkinase stattfindet (Abb. 32). Die Unterbrechung in der Signalübertragung ist demnach auf den Verlust der katalytischen Aktivität und nicht auf eine Störung der Komplexbildung zwischen RH und HoxJ zurückzuführen. Eine H₂-Bindung an das aktive Zentrum war für das HoxC[R411K]-Protein nicht nachweisbar. Der erfolgreiche Einbau von Ni in das Mutantenprotein konnte mit Hilfe des Nickelautoradiogramms kontrolliert werden.

EPR-spektroskopische Untersuchungen am mittels HoxJ^{INPUT}-His₆-Fusionsprotein angereicherten HoxC[R411K]-Protein ergaben, dass sich in dem Protein paramagnetisches Nickel befindet. Entsprechende g-Faktoren wurden sowohl für die oxidierte als auch für die mit H₂ reduzierte Probe detektiert. Das Wildtyp-Protein wurde ebenfalls über das HoxJ^{INPUT}-His₆-Protein angereichert. Hier konnten für die reduzierte RH die g-Faktoren für den Ni-C-Zustand detektiert werden. Unter aeroben Bedingungen wurden in der Wildtyp-RH keine EPR-Signale gemessen. Eine Ni-Kontamination der Wildtyp-RH war somit auszuschließen. Möglicherweise wurde das Mutantenprotein durch den Arg→Lys-Austausch so verändert, dass von der Säulenmatrix stammendes Ni im Protein über den His-tag gebunden und im paramagnetischen Zustand gehalten wird. Das würde erklären, weshalb sowohl für das mit Hilfe eines *Strep*-tags an HoxB als auch das über einen *Strep*-tag an HoxJ unter Ausnutzung der Komplexbildung

zwischen RH und HoxJ gereinigte HoxC[R411K]-Protein kein Ni-C Signal detektiert wurde. Im Gegensatz zum His-tag zeigt der *Strep*-tag keine Affinität zu Nickel. Obwohl die Nickelautoradiographie das Vorhandensein von Ni im HoxC[R411K]-Protein bestätigte, ließen sich im FTIR-Spektrum des angereicherten Mutantenproteins keine der drei diatomaren Fe-Liganden nachweisen. Das bedeutet, dass das aktive Zentrum entweder nicht vollständig maturiert oder sehr instabil ist und schnell wieder auseinander fällt.

Aus Maturationsuntersuchungen an der Hydrogenase 3 von *E. coli* ist bekannt, dass zunächst Fe mit seinen CN- und CO-Liganden in die Vorläuferform der großen Hydrogenase-Untereinheit eingebaut werden muss, bevor Ni inseriert werden kann (Blokesch *et al.* 2002b, Atanassova & Zamble 2005, Leach *et al.* 2005, Böck *et al.* 2006). Experimentell wurde dieses erstmals für die H₂-sensierende Hydrogenase aus *R. eutropha* gezeigt (Winter *et al.* 2005). Bisher liegen noch keine Ergebnisse einer Metallgehaltsanalyse an einem RH-Protein vor, das nur aus der gereinigten großen Untereinheit HoxC_{Strep}[R411K] besteht. Mit Hilfe dieser Analyse könnte abgeklärt werden, ob die große Untereinheit der R411K-Mutante Eisen enthält. Über den *para-/ortho*-H₂-Konversionstests wurde gezeigt, dass die HoxC[R411K]-Mutante nicht mehr in der Lage ist, H₂ zu binden. Es findet keine Spaltung und Rekombination des Substrats H₂ am aktiven Zentrum mehr statt.

Die in dieser Arbeit erzielten Daten ergänzen frühere Arbeiten, die am L4-Motiv der großen Untereinheit HoxH der SH von *R. eutropha* vorgenommen worden sind (Burgdorf *et al.* 2002). Im Wachstumstest in einer Gasatmosphäre von 80 % H₂, 10 % CO₂ und 10 % O₂ waren die resultierenden Transkonjuganten, bei denen das konservierte Arg391 durch Leu bzw. Gln substituiert wurde, nicht mehr in der Lage, mit H₂ als alleiniger Energiequelle zu wachsen. Weiterhin zeigten beide Mutantenproteine keine Fähigkeit mehr zur H₂-abhängigen NAD- bzw. Benzylviologen-Reduktion. Isotopenaustausch-Untersuchungen an den HoxH[R391L/Q]-Proteinen ergaben keine Hinweise eine auf D₂/H⁺-Konversionsaktivität. In einer Immunoblot-Analyse konnte das HoxH[R391L]-Protein nicht mehr detektiert werden. Ein SH-abhängiges Ni-Signal im Nickelautoradiogramm war auf Grund des schnellen proteolytischen Abbaus des Mutantenproteins in der Zelle für dieses Mutantenprotein ebenfalls nicht nachzuweisen (Burgdorf *et al.* 2002). Immunoblot-Analysen der HoxC[R411L/K]-Proteine bestätigten die Bildung der RH-Untereinheiten, die jedoch auch beide einem verstärkten Abbau in der Zelle unterliegen.

Die hohe Sequenzähnlichkeit und die annähernd identischen Positionen der Maxima in den EPR- bzw. FTIR-Spektren lassen den Schluss zu, dass die Struktur des H₂-Sensors von *R. eutropha* weitgehend der von Standard-[NiFe]-Hydrogenasen entspricht (Pierik *et al.* 1998b, Kleihues *et al.* 2000, Bernhard *et al.* 2001). Die H₂-Spaltung am [NiFe]-Zentrum ist verbunden mit einer Translokation eines Protons aus der Brückenposition zwischen den beiden Metallatomen in die unmittelbare Umgebung des aktiven Zentrums (Brecht *et al.* 2003). Für die Aufnahme eines Protons würde sowohl einer der terminalen Cys-Liganden (C60 oder C479) des Ni als auch das Arg411 aus dem L4-Motiv zur Verfügung stehen (Abb. 37). Welcher Aminosäurerest tatsächlich an dem Prozess der H₂-Spaltung in der RH beteiligt ist, bleibt weiterhin ungeklärt, da die verfügbaren Arginin-Mutanten keine H₂-Bindung zeigen.

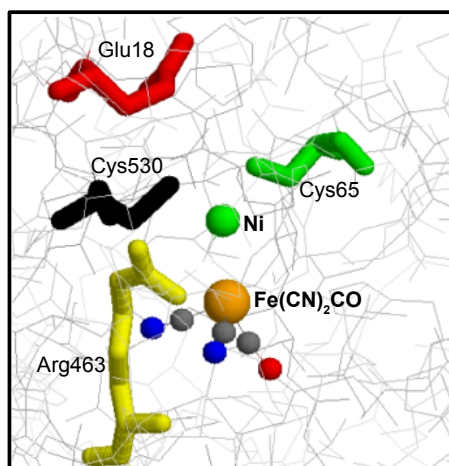


Abb. 37: Ausschnitt aus der Kristallstruktur der [NiFe]-Hydrogenase von *D. gigas*. Die Koordinaten wurden der Brookhaven Protein Datenbank entnommen (2frv). Das Kohlenstoffgerüst der großen Untereinheit ist dunkelgrau, das der kleinen Untereinheit hellgrau dargestellt. Das Glu18 des L0-Motivs ist rot, Cys65 aus dem L2-Motiv ist grün, Arg463 des L4-Motivs ist gelb und das Cys530 aus dem L5-Motiv ist schwarz hervorgehoben. Das [NiFe]-Zentrum und die diatomaren Fe-Liganden sind als Kugeln abgebildet.

Zur Aufklärung der H₂-Spaltung am aktiven Zentrum wurden unter anderem auch Aminosäure-Austausche an den [NiFe]-Hydrogenasen von *D. gigas* und *D. fructosovorans* durchgeführt. Die Mutantenproteine wurden FTIR-spektroskopisch analysiert und kinetisch charakterisiert (de Lacey *et al.* 2000, Dementin *et al.* 2004). Die konservierte Aminosäure Glu25 in der [NiFe]-Hydrogenase von *D. fructosovorans* geht möglicherweise auch eine Wasserstoffbrückenbindung mit einem terminalen Cysteinliganden des Ni ein. Es wird postuliert, dass dieser Glu25-Rest auch an der Stabilisierung des H₂O-Moleküls beteiligt ist, das während der Aktivierung des Enzyms vom [NiFe]-Zentrum entfernt wird (Stadler *et al.* 2002). Ein Austausch des Glutamats an

der Position 25 durch einen Glutamin-Rest bewirkte den Zusammenbruch des schnellen Protonentransfers vom aktiven Zentrum. Die H₂-Bindung wurde dabei jedoch nicht beeinträchtigt (de Lacey *et al.* 2003, Dementin *et al.* 2004).

Für die im Rahmen der vorliegenden Arbeit hergestellte E13Q-Austausch-Mutante in der RH von *R. eutropha* wurden ähnliche Beobachtungen gemacht. Die konservierten Glutamat-Reste sind Bestandteil des L0-Motivs. Das von M. Stein postulierte Modell der H₂-Spaltung beruht auf DFT („density functional theory“)-Kalkulationen, die mit Hilfe von EPR- und FTIR-Daten sowie unter Verwendung der Kristallstruktur der [NiFe]-Hydrogenase von *D. gigas* erstellt wurden. Die Aussagen über den Mechanismus der H₂-Spaltung in der *D. fructosovorans*-Hydrogenase beruhen ausschließlich auf der Analyse von Mutantenproteinen. Es ist daher anzunehmen, dass sowohl das hoch konservierte Glutamat aus dem L0-Motiv als auch das hoch konservierte Arginin aus dem L4-Motiv in den Mechanismus der H₂-Spaltung eingreifen.

Durch die Verfügbarkeit verschiedener hier vorgestellter Aminosäure-Austauschvarianten der RH von *R. eutropha* ist es möglich, die Untersuchungen der H₂-Spaltung am aktiven Zentrum der RH weiter zu intensivieren. Weiterführende Analysen, wie z.B. XAS, HYSCORE- und ENDOR-Spektroskopie, an den entsprechenden gereinigten Mutantenproteinen aus *R. eutropha* sollen zukünftig dabei helfen, die Frage nach dem Protonen- bzw. Elektronentransfer im Bereich des aktiven Zentrums zu beantworten und dazu beitragen, den Mechanismus der H₂-Oxidation und die Ursache für die O₂-Toleranz aufzuklären.

Anhang

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit erschienene Originalpublikation.

Arch Microbiol (2002) 177: 159–166
DOI 10.1007/s00203-001-0371-5

ORIGINAL PAPER

Antje Porthun · Michael Bernhard · Bärbel Friedrich

Expression of a functional NAD-reducing [NiFe] hydrogenase from the gram-positive *Rhodococcus opacus* in the gram-negative *Ralstonia eutropha*

Received: 16 July 2001 / Revised: 5 October 2001 / Accepted: 16 October 2001 / Published online: 20 November 2001
© Springer-Verlag 2001

Abstract The actinomycete *Rhodococcus opacus* MR11 harbors a bidirectional NAD-reducing [NiFe] hydrogenase (SH). This cytoplasmic enzyme is composed of two heterodimeric modules which catalyze distinct enzymatic activities. The hydrogenase moiety mediates H₂:benzyl viologen oxidoreductase activity and the FMN-containing diaphorase module displays NADH:benzyl viologen oxidoreductase activity. The SH of *Rh. opacus* resembles [NiFe] hydrogenases present in strains of the proteobacterium *Ralstonia eutropha* and in species of cyanobacteria. Heterologous expression of active [NiFe] hydrogenases failed in most cases due to protein-assisted maturation processes implicated in the assembly of the NiFe bimetallic site. This study reports on the construction of a recombinant plasmid harboring the four SH subunit genes *hoxFUYH* and the associated endopeptidase gene *hoxW* from *Rh. opacus* under the regime of the SH promoter from *R. eutropha* H16. The resulting recombinant plasmid restored lithoautotrophic growth in a *R. eutropha* mutant impaired in H₂-oxidizing ability. The SH of *Rh. opacus* was functionally active in *R. eutropha* and displayed the typical features described for its natural host. It readily dissociated in vitro into two active subforms. Dissociation was accompanied by the loss of the H₂-dependent NAD-reducing activity, which was partially reconstituted by addition of 5 mM MgSO₄ and 0.5 mM NiCl₂. Activity and stability of the SH from *Rh. opacus* were enhanced almost three-fold by co-overexpression of the SH-associated metal insertion genes *hypA2B2F2* of *R. eutropha*. Under optimal conditions the heterologously expressed *Rh. opacus* SH catalyzed NAD-reduction at a specific activity of 1.7 units per mg protein, which is approximately 30% of the yield obtained for the *R. eutropha* SH. The results indicate that, despite an enormous phylogenetic distance of

the two bacterial species, their SH proteins are highly related.

Keywords *Rhodococcus opacus* · *Ralstonia eutropha* · Heterologous gene expression · Bidirectional NAD-reducing [NiFe] hydrogenase

Abbreviations SH Soluble hydrogenase · SH_{Rh.o.} Soluble hydrogenase of *Rhodococcus opacus* · SH_{R.e.} Soluble hydrogenase of *Ralstonia eutropha* · Rh. *Rhodococcus* · MBH Membrane-bound hydrogenase · BV Benzyl viologen · NBT Nitrotetrazolium bluechloride

Introduction

Hydrogenases catalyze the reversible cleavage of dihydrogen into two protons and two electrons. Metal-containing hydrogenases are grouped into two major classes: (1) [Fe] hydrogenases bear FeS clusters including the H cluster at the active site (Adams 1990; Nicolet et al. 2000). (2) [NiFe] hydrogenases harbor a NiFe cofactor in the large subunit and usually three FeS clusters in the small subunit (Volbeda et al. 1995). The gram-positive actinomycete *Rhodococcus opacus* and the gram-negative proteobacterium *Ralstonia eutropha* share a high GC-content of their DNA (64.8 mol% and 66.7 mol%, respectively) and the ability to grow chemolithoautotrophically with H₂ as a sole source of energy. Although phylogenetically unrelated, both strains harbor plasmid-encoded cytoplasmic hydrogenases (SH), composed of a dimeric NiFe hydrogen:oxidoreductase and a FMN-containing NADH:oxidoreductase module (Schneider et al. 1984; Tran-Betcke et al. 1990). The SH has the capacity to couple H₂ oxidation directly with NAD reduction in a reversible reaction. SH-like hydrogenases are more common than originally envisaged and have been found in a number of cyanobacteria (Hansel and Lindblad 1998).

The SH of *R. eutropha* (SH_{R.e.}) and *Rh. opacus* (SH_{Rh.o.}) are genetically closely related; the four subunits show an overall amino acid identity of 71–86% and the

A. Porthun · M. Bernhard · B. Friedrich (✉)
Institut für Biologie, Humboldt-Universität zu Berlin,
Chausseestr. 117, 10115 Berlin, Germany
e-mail: baerbel.friedrich@rz.hu-berlin.de,
Tel.: +49-30-20938101, Fax: +49-30-20938102

consensus signatures which are typical for the coordination of the NiFe site and the ligation of iron-sulfur clusters (Tran-Betcke et al. 1990; Grzeszik et al. 1997a). Despite this similarity, the two enzymes differ in some biochemical features. The SH_{Rh.o.} dissociates in vitro into two active dimers. This process is reversible and reconstitution to the active tetramer occurs by raising the ionic strength of the buffer and supplementation of nickel chloride (Schneider et al. 1984). Attempts to treat the SH_{R.e.} similarly yield inactive subforms which are unable to reassemble to an active SH holoenzyme (Johannssen et al. 1991). Reassociation of the two subforms to an active tetramer was only observed with *R. eutropha* by expressing the genes for the two modules separately and mixing the cells of the two strains prior to disruption (Massanz et al. 1998).

The SH is an attractive model to study the basis of hydrogen cleavage mechanistically. In addition it also offers insights into the NADH:oxidoreductase reaction since the FMN-containing module shares substantial similarity to

the peripheral part of complex I (Pilkington et al. 1990). Powerful overexpression systems for [NiFe] hydrogenases are scarcely available since a complex posttranslational maturation pathway, implying metal center assembly and specific proteolysis, appears to be a general barrier for high-yield expression of active [NiFe] hydrogenase in a heterologous host like *Escherichia coli* (Friedrich and Schwartz 1993; Maier and Böck 1996; Casalot and Rousset 2001). In this report we demonstrate expression of active *Rh. opacus* SH in *R. eutropha* and show that the recombinant protein widely displays the biochemical properties of its donor.

Materials and methods

Bacterial strains and growth conditions

The strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. *Escherichia coli* XL1-blue (Bullock et al. 1987) and S17-1 (Simon

Table 1 Bacterial strains and plasmids

Strain or plasmid ^a	Relevant characteristics	Source or reference
<i>Ralstonia eutropha</i>		
H16	SH ⁺ MBH ⁺	DSM428, ATCC17699
HF359	SH ⁺ MBH ⁺ , Δ hoxG	Bernhard et al. (1996)
HF424	SH ⁺ MBH ⁺ , Δ hoxFUYHW Δ hoxG	Massanz et al. (1998)
<i>Escherichia coli</i>		
S17-1	Tra ⁺ , recA, pro, thi hsdR chr: RP4-2	Simon et al. (1983)
XL1-Blue	recA, thi hsdR1, supE44, relA1, lac(F ⁺ , proAB, lac ^o , lacZ Δ M15, Tn10[TetI])	Bullock et al. (1987)
<i>Rhodococcus opacus</i> MR11	SH ⁺ , pHG31-a	DSM427
pBluescript SK+	Amp ^r , lacZ'	Stratagene Cloning Systems
pBluescript KS+	Amp ^r , lacZ'	Stratagene Cloning Systems
pACYC177	Amp ^r , Km ^r , p15A ori	New England Biolabs
pGEM-T	P _{T7} , Amp ^r , open circle with T-overhang	Promega Corporation
pSQK10	5.8-kb SstI-AsnI fragment in pBluescript SK+	Grzeszik et al. (1997a)
pEDY309	Tet ^r , lacZ, RP4/RK2 ori	Kleihues et al. (2000)
pCH591	260-bp NdeI-HindIII fragment	Kleihues et al. (2000)
pCH749	0.2-kb PstI-XbaI fragment of pSQK10 in pBluescript KS+	This study
pCH750	0.1-kb PstI-ScaI fragment of pSQK10 in pACYC177	This study
pCH751	4.5-kb ScaI-PmlI fragment of pSQK10 in pCH750	This study
pCH752	0.8-kb NdeI-XmnI fragment of pSQK10 in pCH591	This study
pCH753	4.6-kb NdeI fragment of pCH751 in pCH752	This study
pCH754	3.8-kb PCR fragment, containing <i>R. eutropha</i> hypA2B2F2, in pGEM-T	This study
pCH758	3.8-kb KpnI-SpeI fragment of pCH754, containing <i>R. eutropha</i> hypA2B2F2, in pCH753	This study
pGE15	15-kb HindIII fragment, containing hoxF-hypF2 of <i>R. eutropha</i> , in pVK101	Tran-Betcke et al. (1990)
pGE437	5.9-kb HpaI-SpeI fragment of pCH753, containing <i>Rh. opacus</i> hoxFUYHWI' and the <i>R. eutropha</i> SH promoter, in pEDY309	This study
pGE442	9.7-kb HpaI-SpeI fragment of pCH758, containing <i>Rh. opacus</i> hoxFUYHWI', the <i>R. eutropha</i> SH promoter and <i>R. eutropha</i> hypA2B2F2, in pEDY309	This study

^aStrains with the initial HF are derivatives of *R. eutropha* H16

et al. 1983) were grown in Luria Broth (LB). *Ralstonia eutropha* HF359 (Bernhard et al. 1996) and HF424 (Massanz et al. 1998) were cultivated heterotrophically at 30 °C in a synthetic medium containing 0.2% (w/v) fructose and 0.2% (v/v) glycerol as carbon sources (Friedrich et al. 1982). Lithoautotrophic growth of *R. eutropha* was conducted in mineral salts medium under an atmosphere of hydrogen, carbon dioxide and oxygen (8:1:1, by volume) as described for *Rhodococcus opacus* MR11 (Schlegel et al. 1961).

Recombinant DNA techniques and plasmid constructions

Standard DNA techniques were used (Sambrook et al. 1989). The vector pSQK10 (Grzeszik et al. 1997a) as a template and the two primers 5'-ATTCTGCAGCATATGACGGAGACATCAAGGC-3', 5'-ATATCTAGATACTTCCCGACGGCTTGCG-3' were used to amplify the 5'-region of *hoxF* by PCR and to introduce a *NdeI* site at the ATG start codon. A 0.2-kb *PstI-XbaI* fragment of the resulting PCR product was cloned into pBluescript KS+, yielding plasmid pCH749. Subsequently a 0.1-kb *PstI-ScaI* fragment of pCH749 was inserted into the *PstI-ScaI*-digested, linearized vector pACYC177, yielding plasmid pCH750. The 4.5-kb *ScaI-PmlI* fragment from pSQK10 containing the genes *hoxFUYH* was cloned into the *ScaI-HincII*-digested plasmid pCH750, yielding plasmid pCH751. The residual part of *hoxW* and *hoxI* was cloned as a 0.8-kb *NdeI-XmnI* fragment into plasmid pCH591 (Kleihues et al. 2000), which contained the SH promoter (P_{SH}) of *R. eutropha*, yielding pCH752. The four structural genes of *Rh. opacus* derived from pCH751 were introduced as a 4.6-kb *NdeI* fragment into the *NdeI*-digested pCH752 resulting in pCH753. Subsequently, a 5.9-kb *HpaI-SpeI* fragment of pCH753 containing the P_{SH} -*hoxFUYHWT* region was transferred to the *SpeI-ScaI*-digested broad-host-range vector pEDY309 (Kleihues et al. 2000). The resulting plasmid pGE437 was transferred via conjugation from *E. coli* S17-1 into *R. eutropha* HF424.

The *hypA2B2F2* gene region of *R. eutropha* was amplified by PCR using pGE15 as a template and 5'-GGTACCTCAGCGCTGACCG-3' and 5'-ACTAGTATGCGTGCAGGTATGGCC-3' as primers. The resulting 3.8-kb fragment was hydrolyzed with *KpnI* and *SpeI* and cloned into the *KpnI-SpeI*-cut pCH753 yielding plasmid pCH758. Subsequently the entire hydrogenase gene region, also including *hypA2B2F2*, was transferred as a 9.7-kb *HpaI-SpeI* fragment into the vector pEDY309, yielding plasmid pGE442.

Preparation of soluble extracts

Ralstonia eutropha cells were grown in mineral medium either under heterotrophic or under lithoautotrophic conditions to an optical density at 436 nm of 10–11 or 15–20, respectively. Cells were harvested by centrifugation, washed once with 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7, containing 0.5 mM $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ and 5 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. The cell pellet was resuspended in the same buffer containing 0.1 mM phenylmethylsulfonylfluoride, if not otherwise stated. Cells were disrupted in a French pressure cell at 7.6 MPa and the resulting crude extract was separated into a soluble fraction and a membrane fraction as described earlier (Friedrich et al. 1981a). Protein concentrations were determined by the method of Lowry et al. (1951) with bovine serum albumin as a standard.

Immunoblot analysis

Proteins were separated by electrophoresis in 12.5% SDS-polyacrylamide gels and transferred to nitrocellulose membranes (Schleicher and Schüll) according to a standard protocol (Towbin et al. 1979). SH antigen was identified with a mixture of polyclonal antibodies raised against all four subunits of the SH of *R. eutropha*. Native gel electrophoresis was carried out as described previously (Bernhard et al. 1996). Single subunits of the SH were visualized with antibodies raised against the four individual $\text{SH}_{R.e.}$ subunits.

Enzyme assays

The hydrogenase activity of the SH was determined photometrically in soluble extracts by monitoring the H_2 -dependent reduction of NAD or benzyl viologen (BV) (Schneider and Schlegel 1976) in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8, containing 0.5 mM $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ and 5 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, if not otherwise stated. NADH:oxidoreductase (diaphorase) activity was assayed with soluble extracts in the same buffer using NADH as the electron donor and BV as the acceptor (Schneider and Schlegel 1976).

For in-gel chromogenic detection of enzymatic activities, soluble extracts were separated by native gradient polyacrylamide gel electrophoresis (4–15%) (Bernhard et al. 1996). Overall $\text{H}_2 \rightarrow \text{NAD}$ reduction was determined with gels incubated in H_2 -saturated 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8, containing 0.5 mM $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ and 5 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ supplemented with 0.5 mM NAD and 0.06 mM nitrotriazolium bluechloride (NBT) under an atmosphere of 100% H_2 at 20 °C. For the assay of $\text{H}_2 \rightarrow \text{BV}$ activity the gels were incubated in H_2 -saturated buffer containing 0.6 mM BV. The reaction was started by adding traces of a sodium dithionite stock solution (80 mM) until the buffer turned light blue. The staining was fixed with 2,3,5-triphenyltetrazoliumchloride (600 mM stock solution) until the blue color of the bands turned to red. For the assay of diaphorase activity the gels were incubated in N_2 -saturated buffer containing 0.6 mM BV and 0.5 mM NADH under an atmosphere of 100% N_2 . Sodium dithionite and 2,3,5-triphenyltetrazoliumchloride were added to the buffer as described above.

Results and discussion

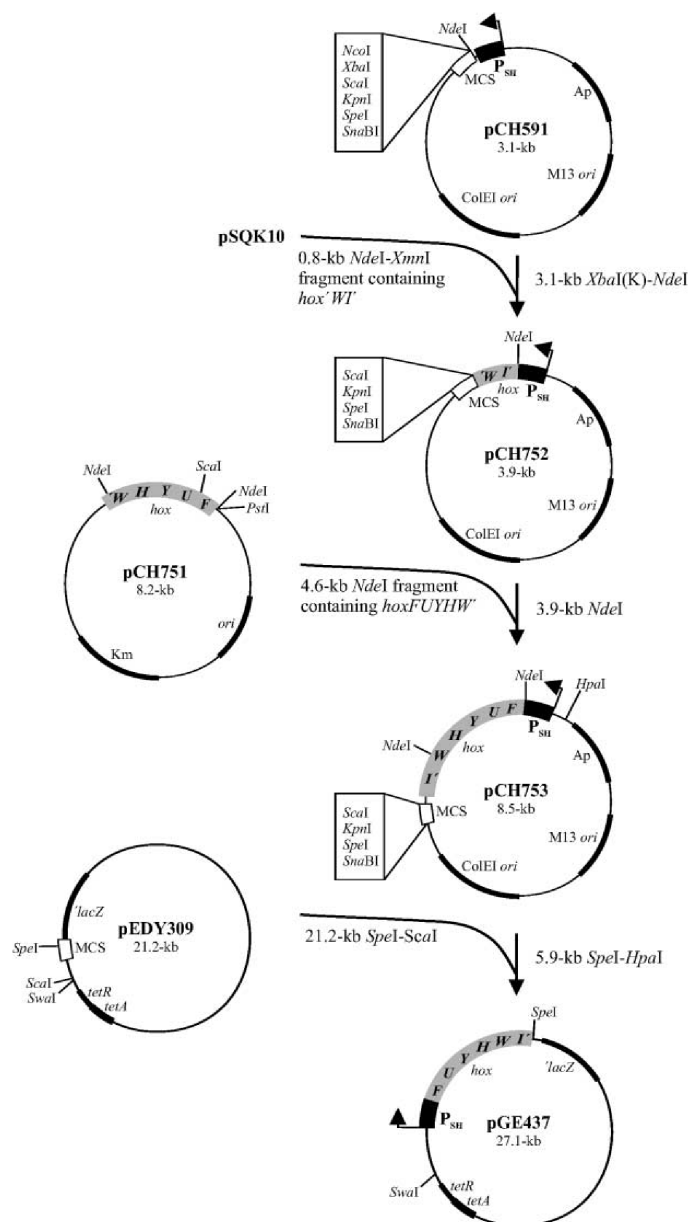
The SH of *Rh. opacus* is physiologically active in *R. eutropha*

For the following reasons, *R. eutropha* was selected as a host in the heterologous expression of the SH genes from *Rh. opacus*: (1) *R. eutropha* shares the ability to grow chemolithoautotrophically under oxic conditions. (2) The strain displays a high sequence conservation as far as the SH subunit genes are concerned (Tran-Betcke et al. 1990; Grzeszik et al. 1997a). (3) Unlike the donor, *R. eutropha* H16 has the advantage to form hydrogenase not only in the presence of H_2 , CO_2 and O_2 , but also under heterotrophic growth conditions, when nutrients are deprived (Friedrich et al. 1981b). (4) Furthermore, standard molecular genetic techniques are available for *R. eutropha*, which opens the perspective of modifying a putative recombinant gene product.

Introduction of the $\text{SH}_{Rh.o.}$ genes into *R. eutropha* encompassed a series of cloning steps which are described in more detail in Materials and methods. The four structural genes *hoxFUYH* from *Rh. opacus* in addition to the carboxypeptidase gene *hoxW* and the 5' part of an incomplete *hoxI* gene (Grzeszik et al. 1997a) were fused to the strong *R. eutropha* SH promoter, yielding plasmid pCH753 (Fig. 1). In contrast to the *Rh. opacus* SH promoter, the *R. eutropha* SH promoter is highly active under heterotrophic conditions (Schwartz et al. 1998). This allows the cultivation of cells under non-explosive conditions. Subcloning of the recombinant 5.9-kb DNA fragment from pCH753 into the broad-host-range vector pEDY309 (Kleihues et al. 2000) enabled us to transfer the resulting plasmid pGE437 by conjugation from *E. coli* S17-1 into *R. eutropha*.

162

Fig.1 Construction of the plasmid pGE437 which directs *Rhodococcus opacus* SH gene expression. Origin and characteristics of plasmids used for the construction are specified in Table 1. The orientation of the *Ralstonia eutropha* SH operon promoter (P_{SH}) is indicated by arrow. The SH gene fragments of *Rh. opacus*, derived from plasmid pSQK10 (Grzeszik et al. 1997a) are marked gray. *K* indicates treatment with Klenow polymerase. Details of the various cloning steps are specified in Materials and methods



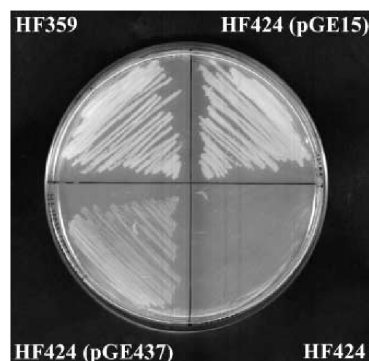


Fig. 2 Lithoautotrophic growth of *R. eutropha* strains. Relevant characteristics of the strains: HF359, SH⁺MBH⁺; HF424, SH⁺MBH⁺; HF424 (pGE15), SH genes from *R. eutropha* cloned in pGE15; HF424 (pGE437), SH genes from *Rh. opacus* cloned in pGE437

The physiological function of the recombinant pGE437-borne SH was tested straightforwardly by growth experiments. To avoid interferences with the native hydrogenases of *R. eutropha*, the mutant HF424, which carries deletions in the SH and MBH subunit genes, was used as a recipient in plasmid transfers. The resulting transconjugants of *R. eutropha* HF424 (pGE437) recovered the ability to grow autotrophically with H₂ as the energy source. From these results we inferred that the SH of *Rh. opacus* was physiologically active in *R. eutropha*. Lithoautotrophic cultivation of the cells on agar plates indicated retarded growth of *R. eutropha* HF424 (pGE437) compared to control strains, such as *R. eutropha* HF424 (pGE15), which harbors the *R. eutropha* SH genes on plasmid pGE15 (Fig. 2). Monitoring growth rates in liquid cultures under lithoautotrophic conditions revealed a doubling time of 6.5 h for *R. eutropha* HF424 (pGE437) compared to 3.5 h for the MBH⁺SH⁺ control *R. eutropha* HF359. The decreased growth rate of the recombinant strain may reflect low expression, less stability, and/or limitation by the posttranslational maturation process.

Enzymatic activity of the recombinant SH

To examine the activity of the recombinant SH_{Rh.o.}, cells of *R. eutropha* HF424 (pGE437) were cultivated on fructose-glycerol minimal medium in parallel to the control strain *R. eutropha* HF424 (pGE15). Under these conditions the promoter of the SH_{Rh.o.} operon permits high-level gene transcription (Schwartz et al. 1998). Soluble extracts were prepared in two ways: (1) according to the protocol designed for *R. eutropha* the cells were suspended in buffer of low ionic strength (low-salt buffer), and (2) according

Table 2 Enzymatic activity of the recombinant SH in soluble extracts

Strain		Specific activity (U/mg protein) ^a			
		H ₂ →NAD ^b	H ₂ →NAD ^c	H ₂ →BV	NADH→BV
HF424 (pGE437)	d	0.06	0.29	1.05	1.34
	e	0.08	0.74	2.94	1.77
HF424 (pGE15)	d	4.53	2.49	2.99	5.24
	e	6.94	5.75	4.08	5.30
HF424 (pGE442)	d	0.09	0.82	3.22	1.69
	e	0.08	1.66	7.75	2.09
HF424	d	<0.01	<0.01	nd	0.44
	e	<0.01	<0.01	nd	0.48

^aMean values of two independent experiments

^bH₂-dependent NAD reduction rate assayed in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0

^cH₂-dependent NAD reduction rate assayed in 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5 mM NiCl₂, 5 mM MgSO₄

^dSoluble extract was prepared with 50 mM Tris-HCl, pH 7

^eSoluble extract was prepared with 50 mM Tris-HCl, pH 7, 0.5 mM NiCl₂, 5 mM MgSO₄

nd Not determined

to the protocol for *Rh. opacus* the buffer was supplemented with 5 mM MgSO₄ and 0.5 mM NiCl₂ (high-salt buffer) (Grzeszik et al. 1997a). The H₂-dependent NAD-reducing activity was determined in both low- and high-salt buffer (Table 2). Only traces of recombinant SH_{Rh.o.} activity occurred when NiCl₂ and MgSO₄ were omitted from the assay buffer. The activity increased to almost ten-fold when extract preparation as well as assay buffer contained the additives. This observation is consistent with the previously described properties of purified SH from *Rh. opacus*, showing that in low-salt buffer the tetrameric protein dissociates into two dimeric forms accompanied by the failure to reduce the physiological electron acceptor NAD (Schneider et al. 1984). It is interesting to note that the H₂-dependent BV-reduction rate of the SH_{Rh.o.}, assigned to the hydrogenase dimer, was also enhanced by salt supplementation, whereas almost no salt effect was observed with respect to the NADH→BV-oxidation rate. The latter activity is attributed to the diaphorase module (Table 2). As expected, the SH_{Rh.o.} activity level in extracts of the control *R. eutropha* HF424 (pGE15) showed only little if any response to the salt concentration of the buffer (Table 2).

To confirm that the low H₂-dependent NAD-reducing rate of the recombinant SH_{Rh.o.} was due to protein dissociation, immunochemical experiments were conducted using antibodies raised against the individual subunits of the *R. eutropha* SH. Previous experiments have shown that SH_{Rh.o.}-specific antibodies cross-react with the antigen of *Rh. opacus* (Schneider et al. 1984). With the aid of anti-HoxH and anti-HoxF serum SH-related antigen was identified in extracts of *R. eutropha* HF424 (pGE437) separated by native PAGE (Fig. 3). In both blots, single bands occurred which migrated differently from the band obtained with the *R. eutropha* SH holoenzyme (Fig. 3A).

164

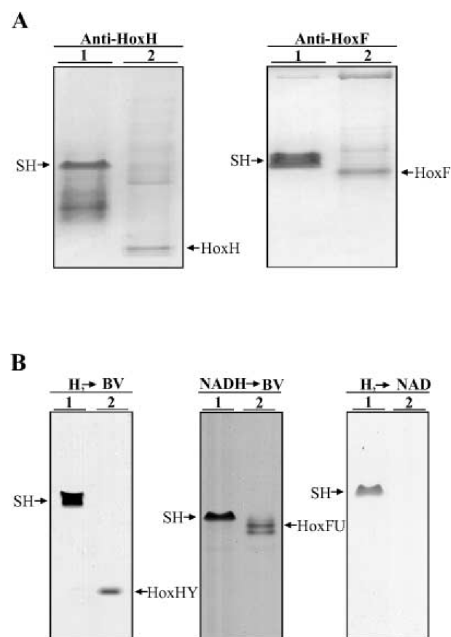


Fig. 3A, B Dissociation of recombinant SH during native gel electrophoresis. Analysis of soluble extracts separated on a native polyacrylamide gradient gel (4–15%). The concentration of protein added per lane is indicated in parentheses. **A** Immunoblot of extracts using antibodies raised against HoxF and HoxH of *R. eutropha*. Lanes: 1 H16 (5 µg), 2 HF424 (pGE437) (50 µg). **B** In-gel enzyme activity staining. Lanes: 1 HF359 (100 µg), 2 HF424 (pGE437) (100 µg), 3 HF359 (50 µg), 4 HF424 (pGE437) (50 µg), 5 HF359 (5 µg), 6 HF424 (pGE437) (50 µg).

The HoxH-containing band exhibited high electrophoretic mobility and the HoxF-containing antigen migrated slightly faster than the holoenzyme, possibly forming aggregates of the diaphorase module. A similar electrophoretic pattern was observed in a comparative immunological screening using extracts obtained from various strains of *Rh. opacus* and *R. eutropha* (Grzeszik et al. 1997b).

To test whether the immunological signals correlate with enzymatically active subforms of the $SH_{Rh.o.}$, in-gel activity staining assays were performed (Fig. 3B). The fast-migrating HoxH-related band revealed $H_2 \rightarrow BV$ activity, whereas a signal for $NADH \rightarrow BV$ activity developed at a position equivalent to the HoxF-containing antigen. No activity band occurred with NAD as the electron acceptor (Fig. 3B), which is in agreement with the notion that a recombinant $SH_{Rh.o.}$ holoenzyme is absent and that the $SH_{Rh.o.}$ dissociates during electrophoresis (Fig. 3A). Addition of $NiCl_2$ and $MgSO_4$ to the gel and the running

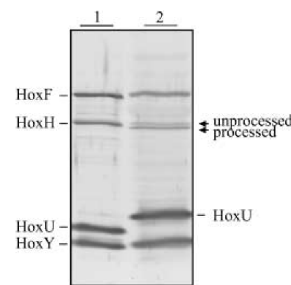


Fig. 4 Immunoblot analysis of soluble extracts separated on SDS-polyacrylamide gel. The concentration of protein added per lane is indicated in parentheses. The blot was developed with a mixture of antibodies raised against the four subunits of the *R. eutropha* SH. Lanes: 1 Extract of *R. eutropha* HF359 (10 µg), 2 extract of *R. eutropha* HF424 (pGE437) (50 µg). Arrows mark the position of the precursor and the mature form of HoxH.

buffer did not prevent dissociation of the recombinant protein as shown for the purified SH from *Rh. opacus* (Schneider et al. 1984). It is likely that less active and less concentrated recombinant $SH_{Rh.o.}$ behaves differently in this respect. The immunological data clearly support the interpretation that a loss or a dramatic decrease of H_2 -dependent NAD-reducing activity results from dissociation of the $SH_{Rh.o.}$ tetramer into two enzymatically active, rather stable dimeric subforms.

Immunoblot analysis of soluble extracts from cells of *R. eutropha* HF424 (pGE437) separated by SDS-PAGE revealed four bands which correlated with the two large subunits HoxF and HoxH and the two small subunits HoxU and HoxY (Fig. 4). The distinct migration behavior of the HoxH and HoxU polypeptides, which differ from the pattern obtained with $SH_{R.e.}$, has been observed before (Grzeszik et al. 1997b). The occurrence of two HoxH bands likely reflects the presence of the precursor and the proteolytically processed mature form of the polypeptide, indicating that maturation of the active-site-containing subunit is a crucial step in the expression of active SH.

Enhancement of recombinant SH expression

If the heterologous system is being used for the isolation of *Rh. opacus* SH on a large preparative scale, it would be most desirable to increase the level of active tetramer. One of the reasons which may account for the low stability of the recombinant $SH_{Rh.o.}$ may be the complex protein-assisted maturation, which is provided by single-copy gene products of *R. eutropha*.

In a first attempt we tested whether co-overexpression of *hyp* genes, whose products are involved in NiFe cofactor insertion, improves the yield of active SH. Studies with *E. coli* hydrogenase 3 (Maier and Böck 1996; Magalon and Böck 2000; Blokesch et al. 2001) and our own in-

vestigations on the SH and MBH proteins of *R. eutropha* (Dermedde et al. 1996) have shown that at least six *hyp* gene products in addition to the endopeptidase are involved in metal-center assembly. The cloned DNA fragment derived from *Rh. opacus* contained only the four SH subunit genes, the protease gene *hoxW* and the 5' part of *hoxI* (Grzeszik et al. 1997a). *hoxI* is unessential for SH activity as shown for *hoxI* of *R. eutropha* (Thiemermann et al. 1996).

The *hyp* genes in the recombinant strain *R. eutropha* HF424 (pGE437) are present on megaplasmid pHG1. *hypA1B1F1CDE* are located in the MBH operon and three duplicated genes *hypA2B2* and *F2* are constituents of the SH operon (Dermedde et al. 1996; Wolf et al. 1999). Genes in plasmid pGE437, the DNA region encompassing *hypA2B2F2* of *R. eutropha* was amplified by PCR. The resulting 3.8-kb product was ligated with the incomplete part of the *hoxI* gene in plasmid pCH753. Subcloning of the enlarged DNA fragment into the broad-host-range vector pEDY309 yielded plasmid pGE442.

Transconjugants of *R. eutropha* HF424 (pGE442) were cultivated under heterotrophic hydrogenase-derepressing conditions and cell extracts derived therefrom were assayed for enzymatic activity (Table 2). An almost three-fold increase of $H_2 \rightarrow NAD$ -reducing as well as $H_2 \rightarrow BV$ -reducing activity was obtained, whereas the $NADH \rightarrow BV$ -oxidation rate was only slightly enhanced. This result is in line with the assumption that introduction of the three *hyp* genes improved the stability and/or efficiency of building the NiFe active site. Not surprisingly, the diaphorase activity was scarcely affected by increasing the *hyp* gene dosage. This observation correlates with the data indicating that the Hyp proteins exclusively interact with the hydrogenase and not with the diaphorase moiety.

Recently evidence was presented that HypF participates in the delivery of two CN^- and one CO ligand to the active site (Paschos et al. 2001). The three diatomic ligands are covalently bound to the iron (Happe et al. 2000). The precise function of HypA is still unknown. HypB is considered to bind nickel and to assist its insertion in a GTP-driven reaction (Maier and Böck 1996; Casalot and Rousset 2001). Thus amplification of the remaining *hypC*, *hypD* and *hypE* genes may further enhance the yield of active $SH_{Rh.o.}$. In this study, however, we focused on the reconstruction of the SH operon (*hoxFUYHWIhypA2B2F2*) as present in *R. eutropha* and provided the pHG1-borne *hypCDE* genes in *trans*.

Concluding remarks

So far, the only successful heterologous expression of a cloned [NiFe] hydrogenase was achieved by interspecies transfer of the *hyn* genes from *Desulfovibrio gigas* into *Desulfovibrio fructosovorans*. Only a low level of activity was obtained for the recombinant protein (Rousset et al. 1998). In this communication we show functional expression of the SH genes from the gram-positive *Rh. opacus* in the gram-negative host *R. eutropha*. The H_2 -oxidizing

activity with NAD as the physiological electron acceptor increased from 10% to almost 30% of the *R. eutropha* control by coexpression of the SH-linked accessory genes *hypA2B2F2* at an amplified level. The recombinant SH readily dissociated in vitro into the hydrogenase and the diaphorase module. It is likely that this process also occurs partially in vivo since the overall $H_2 \rightarrow NAD$ activity was relatively low. Nevertheless, the heterologous expression provides a useful tool to isolate relatively stable dimeric subforms. These subforms can be further explored spectroscopically for the presence of a modified active site and a second FMN group as proposed for the *R. eutropha* SH (Albracht and Hedderich 2000; Happe et al. 2000). Furthermore the diaphorase module will now be accessible to detailed EPR studies.

The fact that the SH genes from *Rh. opacus* are functional in a phylogenetically very distant host points to a close relationship. The two sets of SH genes revealed an identity on the DNA level between 75% and 82%. The plasmid-borne SH genes of *Rh. opacus* are directly flanked by a transposase gene (Grzeszik et al. 1997a) and the SH genes on megaplasmid pHG1 are located in a region of "junk DNA" containing numerous nested mobile elements (B. Friedrich and coworkers, unpublished results). Thus it seems likely that, despite distinct biochemical features, the SH gene products of the two organisms have undergone a relatively recent divergence.

Acknowledgements We are grateful to Claudia Grzeszik for providing the *Rh. opacus* DNA. We thank Angelika Strack for excellent technical assistance and Oliver Lenz for critical reading of the manuscript. This research was supported by the European Union biotechnology program "structural biology", the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) and the Fonds der Chemischen Industrie.

References

- Adams MWW (1990) The structure and mechanism of iron-hydrogenases. *Biochim et Biophys Acta* 594: 105–176
- Albracht SPJ, Hedderich R (2000) Learning from hydrogenases: location of a proton pump and of a second FMN in bovine NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I). *FEBS Letters* 24275: 1–6
- Bernhard M, Schwartz E, Rietdorf J, Friedrich B (1996) The *Alcaligenes eutrophus* membrane-bound hydrogenase gene locus encodes functions involved in maturation and electron transport coupling. *J Bacteriol* 178: 4522–4529
- Blokesch M, Magalon A, Böck A (2001) Interplay between the specific chaperon-like proteins HybG and HypC in maturation of hydrogenases 1, 2, and 3 from *E. coli*. *J Bacteriol* 183: 2817–2822
- Bullock WO, Fernandez JM, Short JM (1987) XL1-blue: a high efficiency plasmid transforming *recA⁻* *Escherichia coli* strain with betagalactosidase selection. *Bio Techniques* 5: 376–378
- Casalot L, Rousset M (2001) Maturation of the [NiFe] hydrogenases. *TRENDS in Microbiol* 9: 228–237
- Dermedde J, Eitinger T, Patenge N, Friedrich B (1996) *hyp* gene products in *Alcaligenes eutrophus* are part of a hydrogenase-maturation system. *Eur J Biochem* 235: 351–358
- Friedrich B, Schwartz E (1993) Molecular biology of hydrogen utilization in aerobic chemolithotrophs. *Annu Rev Microbiol* 47: 351–383

- Friedrich B, Heine E, Fink A, Friedrich CG (1981a) Nickel requirement for hydrogenase formation in *Alcaligenes eutrophus*. J Bacteriol 145: 1144–1149
- Friedrich CG, Friedrich B, Bowien B (1981b) Formation of enzymes of autotrophic metabolism during heterotrophic growth of *Alcaligenes eutrophus*. J Gen Microbiol 122: 69–78
- Friedrich CG, Schneider K, Friedrich B (1982) Nickel in the catalytically active hydrogenase of *Alcaligenes eutrophus*. J Bacteriol 152: 42–48
- Grzeszik C, Lübbers M, Reh M, Schlegel HG (1997a) Genes encoding the NAD-reducing hydrogenase of *Rhodococcus opacus* MR11. Microbiology 143: 1271–1286
- Grzeszik C, Roß K, Schneider K, Reh M, Schlegel HG (1997b) Location, catalytic activity, and subunit composition of NAD-reducing hydrogenases of some *Alcaligenes* strains and *Rhodococcus opacus* MR22. Arch Microbiol 167: 172–176
- Hansel A, Lindblad P (1998) Towards optimization of cyanobacteria as biotechnologically relevant producers of molecular hydrogen, a clean and renewable energy source. Appl Microbiol Biotechnol 50: 153–160
- Happe RP, Roseboom W, Eger G, Friedrich CG, Massanz C, Friedrich B, Albracht SPJ (2000) Unusual FTIR and EPR properties of the H₂-activating site of the cytoplasmic NAD-reducing hydrogenase from *Ralstonia eutropha*. FEBS Letters 23223: 259–263
- Johannssen W, Gerberding H, Rohde M, Zaborosch C, Mayer F (1991) Structural aspects of the soluble NAD-dependent hydrogenase isolated from *Alcaligenes eutrophus* H16 and from *Nocardia opaca* 1b. Arch Microbiol 155: 303–308
- Kleihues L, Lenz O, Bernhard M, Buhrke T, Friedrich B (2000) The H₂ sensor of *Ralstonia eutropha* is a member of the subclass of regulatory [NiFe] hydrogenases. J Bacteriol 182: 2716–2724
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 193: 265–275
- Magalon A, Böck A (2000) Dissection of the maturation reactions of the [NiFe] hydrogenase 3 from *Escherichia coli* taking place after nickel incorporation. FEBS Letters 473: 254–258
- Maier T, Böck A (1996) Nickel incorporation into hydrogenases. In: Hausinger RP, Eichhorn GL, Marilli LG (eds) Mechanism of metalcenter assembly. Advances in Inorganic Biochemistry series. New York: VHC, pp 173–192
- Massanz C, Schmidt S, Friedrich B (1998) Subforms and in vitro reconstitution of the NAD-reducing hydrogenase of *Alcaligenes eutrophus*. J Bacteriol 180: 1023–1029
- Nicolet Y, Lemon BJ, Fontecilla-Camps JC, Peters JW (2000) A novel FeS cluster in Fe-only hydrogenases. TIBS 25: 138–143
- Paschos A, Glass RS, Böck A (2001) Carbamoylphosphate requirement for synthesis of the active center of [NiFe]-hydrogenases. FEBS Letters 488: 9–12
- Pilkington SJ, Skehel JM, Gennis RB, Walker JE (1990) Relationship between mitochondrial NADH-ubiquinone reductase and a bacterial NAD-reducing hydrogenase. Biochemistry 30: 2166–2175
- Rousset M, Magro V, Forget N, Guigliarelli B, Belaich JP, Hatchikian EC (1998) Heterologous expression of the *Desulfovibrio gigas* [NiFe] hydrogenase in *Desulfovibrio fructosovorans* MR400. J Bacteriol 180: 4982–4986
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning. A laboratory manual. In: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York
- Schlegel HG, Kaltwasser H, Gottschalk G (1961) Ein Submersverfahren zur Kultur Wasserstoff-oxidierender Bakterien: Wachstumsphysiologische Untersuchungen. Arch Mikrobiol 38: 209–222
- Schneider K, Schlegel HG (1976) Purification and properties of soluble hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus* H16. Biochim et Biophys Acta 452: 66–80
- Schneider K, Schlegel HG, Jochim K (1984) Effect of nickel on activity and subunit composition of purified hydrogenase from *Nocardia opaca* 1b. Eur J Biochem 138: 533–541
- Schwartz E, Gerischer U, Friedrich B (1998) Transcriptional regulation of *Alcaligenes eutrophus* hydrogenase genes. J Bacteriol 180: 3197–3204
- Simon R, Prierer U, Pühler A (1983) A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. Biotechnology 1: 717–743
- Thiemermann S, Darnedde J, Bernhard M, Schroeder W, Massanz C, Friedrich B (1996) Carboxyl-terminal processing of the cytoplasmic NAD-reducing hydrogenase of the *Alcaligenes eutrophus* requires the *hoxW* gene product. J Bacteriol 178: 2368–2374
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci USA 76: 4350–4357
- Tran-Betcke A, Warnecke A, Böcker C, Zaborosch C, Friedrich B (1990) Cloning and nucleotide sequences of the genes for the subunits of NAD-reducing hydrogenase of *Alcaligenes eutrophus* H16. J Bacteriol 172: 2920–2929
- Volbeda A, Charon MH, Piras C, Hatchikian EC, Frey M, Fontecilla-Camps JC (1995) Crystal structure of nickel-iron hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*. Nature 373: 580–587
- Wolf I, Buhrke T, Darnedde J, Pohlmann A, Friedrich B (1998) Duplication of *hyp* genes involved in maturation of [NiFe] hydrogenases in *Alcaligenes eutrophus* H16. Arch Microbiol 170: 451–459

Literaturverzeichnis

- Adams, M.** 1990. The structure and mechanism of iron-hydrogenases. *Biochim et Biophys Acta* 594: 105-176.
- Adams, M., Mortenson, L. and Chen, J.** 1981. Hydrogenase. *Biochim et Biophys Acta* 594: 105-176.
- Albracht, S.** 1994. Nickel hydrogenases: in search of the active site. *Biochim et Biophys Acta* 1188: 167-204.
- Appel, J. and Schulz, R.** 1998. Hydrogen metabolism in organisms with oxygenic photosynthesis: hydrogenases as important regulatory devices for a proper redox poising. *J Photochem Photobiol* 47: 1-11.
- Arendsen, A., Hadden, J., Card, G., McAlpine, A., Bailey, S., Zaitsev, V., Duke, E., Lindley, P., Kröckel, M., Trautwein, A., Feiters, M., Charnock, J., Graner, C., Marritt, S., Thomson, A., Kooter, I., Johnson, M., van der Berg, W., van Dongen, W. and Hagen, W.** 1998. The 'prismane' protein resolved: X-ray structure at 1.7 Å and multiple spectroscopy of two novel 4Fe clusters. *J Biol Inorg Chem* 3: 81-95.
- Atanassova, A. and Zamble, D.** 2005. *Escherichia coli* HypA is a zinc metalloprotein with a weak affinity for nickel. *J Bacteriol* 187: 4689-4697.
- Aubert, C., Brugna, M., Dolla, A., Bruschi, M. and Giudici-Orticoni, M.** 2000. A sequential electron transfer from hydrogenases to cytochromes in sulfate-reducing bacteria. *Biochim et Biophys Acta* 1476: 85-92.
- Berlier, Y., Lespinat, P. and Dimon, B.** 1990. A gas chromatographic-mass spectrometric technique for studying simultaneous hydrogen-deuteron exchange and para-orthohydrogen conversion in hydrogenases of *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough. *Anal Biochem* 188: 427-431.
- Bernhard, M., Benelli, B., Hochkoeppler, A., Zannoni, D. and Friedrich, B.** 1997. Functional and structural role of the cytochrome *b* subunit of the membrane-bound hydrogenase complex of *Alcaligenes eutrophus* H16. *Eur J Biochem* 248: 179-186.
- Bernhard, M., Buhrke, T., Bleijlevens, B., de Lacey, A., Fernandez, V., Albracht, S. and Friedrich, B.** 2001. The H₂ sensor of *Ralstonia eutropha*. Biochemical characteristics, spectroscopic properties, and its interaction with a histidine protein kinase. *J Biol Chem* 276: 15592-15597.
- Bernhard, M., Friedrich, B. and Siddiqui, R.** 2000. *Ralstonia eutropha* TF93 is blocked in tat-mediated protein export. *J Bacteriol* 182: 581-588.
- Bernhard, M., Schwartz, E., Rietdorf, J. and Friedrich, B.** 1996. The *Alcaligenes eutrophus* membrane-bound hydrogenase gene locus encodes functions involved in maturation and electron transport coupling. *J Bacteriol* 178: 4522-4529.
- Bertrand, P., Dole, F., Asso, M. and Guigliarelli, B.** 2000. Is there a rate-limiting step in the catalytic cycle of Ni-Fe hydrogenases? *J Biol Inorg Chem* 5: 682-691.

- Bianco, P., Haladjian, J., Bruschi, M. and Guerlesquin, F.** 1992. Reactivity of [Fe] and [Ni-Fe-Se] hydrogenases with their oxido-reduction partner, the tetraheme cytochrome c₃. *Res Commun* 189: 633-639.
- Bibikov, S., Barnes, L., Gitin, Y. and Parkinson, J.** 2000. Domain organization and flavin adenine dinucleotide-binding determinants in the aerotaxis signal transducer Aer of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 5830-5835.
- Black, L., Fu, C. and Maier, R.** 1994. Sequences and characterization of hupU and hupV genes of *Bradyrhizobium japonicum* encoding a possible nickel-sensing complex involved in hydrogenase expression. *J Bacteriol* 176: 7102-7106.
- Bleijlevens, B., Faber, B. and Albracht, S.** 2001. The [NiFe] hydrogenase from *Allochromatium vinosum* studied in EPR-detectable states: H/D exchange experiments that yield new information about the structure of the active site. *J Biol Inorg Chem* 6: 763-769.
- Blokesch, M. and Böck, A.** 2002. Maturation of [NiFe]-hydrogenases in *Escherichia coli*: the HypC cycle. *J Mol Biol* 324: 287-296.
- Blokesch, M., Paschos, A., Theodoratou, E., Bauer, A., Hube, M. and Böck, A.** 2002a. Metal Insertion into Proteins. *Biochem Soc Trans* 30:
- Blokesch, M., Paschos, A., Theodoratou, E., Bauer, A., Hube, M., Huth, S. and Böck, A.** 2002b. Metal insertion into NiFe-hydrogenases. *Biochem Soc Trans* 30: 674-680.
- Blokesch, M., Rohrmoser, M., Rode, S. and Böck, A.** 2004. HybF, a zinc-containing protein involved in NiFe hydrogenase maturation. *J Bacteriol* 186: 2603-2611.
- Böck, A., King, P., Blokesch, M. and Posewitz, M.** 2006. Maturation of hydrogenases. *Adv Microb Physiol* 5: 1-71.
- Böhm, R., Sauter, M. and Böck, A.** 1990. Nucleotide sequence and expression of an operon in *Escherichia coli* coding for formate hydrogenlyase components. *Mol Microbiol* 4: 231-243.
- Brecht, M., van Gastel, M., Buhrke, T., Friedrich, B. and Lubitz, W.** 2003. Direct detection of a hydrogen ligand in the [NiFe] center of the regulatory H₂-sensing hydrogenase from *Ralstonia eutropha* in its reduced state by HYSCORE and ENDOR spectroscopy. *J Am Chem Soc* 125: 13075-13083.
- Buhrke, T.** 2002. Der H₂-Sensor von *Ralstonia eutropha*: Struktur-Funktions-Beziehungen einer neuartigen [NiFe]-Hydrogenase. Dissertation. Humboldt-Universität zu Berlin.
- Buhrke, T. and Friedrich, B.** 1998. *hoxX (hypX)* is a functional member of the *Alcaligenes eutrophus hyp* gene cluster. *Arch Microbiol* 170: 460-463.
- Buhrke, T., Bleijlevens, B., Albracht, S. and Friedrich, B.** 2001. Involvement of *hyp* gene products in maturation of the H₂-sensing [NiFe] hydrogenase of *Ralstonia eutropha*. *J Bacteriol* 183: 7087-7093.

- Buhrke, T., Brecht, M., Lubitz, W. and Friedrich, B.** 2002. The H₂ sensor of *Ralstonia eutropha*: biochemical and spectroscopic analysis of mutant proteins modified at a conserved glutamine residue close to the [NiFe] active site. *J Biol Inorg Chem* 7: 897-908.
- Buhrke, T., Lenz, O., Krauß, N. and Friedrich, B.** 2005a. Oxygen tolerance of the H₂-sensing [NiFe] hydrogenase from *Ralstonia eutropha* H16 is based on limited access of oxygen to the active site. *J Biol Chem* 280: 23791-23796.
- Buhrke, T., Lenz, O., Porthun, A. and Friedrich, B.** 2004. The H₂-sensing complex of *Ralstonia eutropha*: interaction between a regulatory [NiFe] hydrogenase and a histidine protein kinase. *Mol Microbiol* 51: 1677-1689.
- Buhrke, T., Löscher, S., Lenz, O., Schlodder, E., Zebger, I., Andersen, L., Hildebrandt, P., Meyer-Klaucke, W., Dau, H., Friedrich, B. and Haumann, M.** 2005b. Reduction of unusual iron-sulfur clusters in the H₂-sensing regulatory Ni-Fe hydrogenase from *Ralstonia eutropha*. *J Biol Chem* 280: 19488-19495.
- Bui, E. and Johnson, P.** 1996. Identification and characterization of [Fe]-hydrogenases in the hydrogenosome of *Trichomonas vaginalis*. *Mol Biochem Parasitol* 76: 305-310.
- Burgdorf, T., de Lacey, A. and Friedrich, B.** 2002. Functional analysis by site-directed mutagenesis of the NAD(+)-reducing hydrogenase from *Ralstonia eutropha*. *J Bacteriol* 184: 6280-6288.
- Burgdorf, T., Lenz, O., Buhrke, T., van der Linden, E., Jones, A., Albracht, S. and Friedrich, B.** 2005a. [NiFe]-hydrogenases of *Ralstonia eutropha* H16: modular enzymes for oxygen-tolerant biological hydrogen oxidation. *J Mol Microbiol Biotechnol* 10: 181-196.
- Burgdorf, T., Löscher, S., Liebisch, P., van der Linden, E., Galander, M., Lendzian, F., Meyer-Klaucke, W., Albracht, S., Friedrich, B., Dau, H. and Haumann, M.** 2005b. Structural and oxidation-state changes at its nonstandard Ni-Fe site during activation of the NAD-reducing hydrogenase from *Ralstonia eutropha* detected by X-ray absorption, EPR, and FTIR spectroscopy. *J Am Chem Soc* 127: 576-592.
- Burgdorf, T., van der Linden, E., Bernhard, M., Yin, Q., Back, J., Hartog, A., Muijsers, A., de Koster, C., Albracht, S. and Friedrich, B.** 2005c. The soluble NAD⁺-reducing [NiFe]-hydrogenase from *Ralstonia eutropha* H16 consists of six subunits and can be specifically activated by NADPH. *J Bacteriol* 187: 3122-3132.
- Buurmann, G., Shima, S. and Thauer, R.** 2000. The metal-free hydrogenase from methanogenic archaea: evidence for a bound cofactor. *FEBS Lett* 485: 200-204.
- Cammack, R., Fernandez, V. and Hatchikian, E.** 1994. Nickel-iron hydrogenase. *Methods Enzymol* 234: 43-68.
- Cammack, R., Robson, R. and Frey, M.** 1997. Hydrogen as a fuel: Learning from nature. Taylor & Francis, London.

- Cammack, R., Robson, R. and Frey, M.** 2001. Hydrogen as a fuel: Learning from nature. Taylor & Francis, London.
- Carepo, M., Tierney, D., Brondino, C., Yang, T., Pamplona, A., Telser, J., Moura, I., Moura, J. and Hoffman, B.** 2002. ^{17}O ENDOR detection of a solvent-derived Ni-(OH(x))-Fe bridge that is lost upon activation of the hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*. *J Am Chem Soc* 124: 281-286.
- Cauvin, B., Colbeau, A. and Vignais, P.** 1991. The hydrogenase structural operon in *Rhodobacter capsulatus* contains a third gene, *hupM*, necessary for the formation of a physiologically competent hydrogenase. *Mol Microbiol* 5: 2519-2527.
- Chen, B. and Przybyla, A.** 1994. An efficient site-directed mutagenesis method based on PCR. *Biotechniques* 17: 657-659.
- Colpas, G., Maroney, M., Bagyinka, C., Kumar, M., Willis, W., Suib, S., Mascharak, P. and Baidya, N.** 1991. X-ray spectroscopic studies of nickel complexes, with application to the structure of nickel sites in hydrogenases. *Inorg Chem* 30: 920-928.
- Dau, H., Liebisch, P. and Haumann, M.** 2003. X-ray absorption spectroscopy to analyze nuclear geometry and electronic structure of biological metal centers-potential and questions examined with special focus on the tetra-nuclear manganese complex of oxygenic photosynthesis. *Anal Bioanal Chem* 376: 562-583.
- Davis, R., Botstein, D. and Roth, J.** 1980. Advanced bacterial genetics. A manual for genetic engineering. Cold Spring Harbor, NY.
- De Gioia, L., Fantucci, P., Guigliarelli, B. and Bertrand, P.** 1999a. Ab initio investigation of the structural and electronic differences between active-site models of [NiFe] and [NiFeSe] hydrogenases. *Intern J Quant Chem* 73: 187-195.
- De Gioia, L., Fantucci, P., Guigliarelli, B. and Bertrand, P.** 1999b. Ni-Fe Hydrogenases: A density functional theory study of active site models. *Inorg Chem* 38: 2658-2662.
- De Lacey, A., Fernandez, V., Rousset, M., Cavazza, C. and Hatchikian, EC.** 2003. Spectroscopic and kinetic characterization of active site mutants of *Desulfovibrio fructosovorans* Ni-Fe hydrogenase. *J Biol Inorg Chem* 8: 129-134.
- De Lacey, A., Hatchikian, E., Volbeda, A., Frey, M., Fontecilla-Camps, J. and Fernandez, V.** 1997. Infrared-Spectroelectrochemical Characterization of the [NiFe] Hydrogenase of *Desulfovibrio gigas*. *J Am Chem Soc* 119: 7181-7189.
- De Lacey, A., Pardo, A., Fernandez, V., Dementin, S., Adryanczyk-Perrier, G., Hatchikian, E. and Rousset, M.** 2004. FTIR spectroelectrochemical study of the activation and inactivation processes of [NiFe] hydrogenases: effects of solvent isotope replacement and site-directed mutagenesis. *J Biol Inorg Chem* 9: 636-642.
- De Lacey, A., Santamaria, E., Hatchikian, E. and Fernandez, V.** 2000. Kinetic characterization of *Desulfovibrio gigas* hydrogenase upon selective chemical

modification of amino acid groups as a tool for structure-function relationships. *Biochim et Biophys Acta* 1481: 371-380.

Dementin, S., Burlat, B., de Lacey, A., Pardo, A., Adryanczyk-Perrier, G., Guigliarelli, B., Fernandez, V. and Rousset, M. 2004. A glutamate is the essential proton transfer gate during the catalytic cycle of the [NiFe] hydrogenase. *J Biol Chem* 279: 10508-10513.

Dernedde, J., Eitingер, T., Patenge, N. and Friedrich, B. 1996. *hyp* gene products in *Alcaligenes eutrophus* are part of a hydrogenase-maturation system. *Eur J Biochem* 235: 351-358.

Dixon, R. 1978. Nitrogenase-hydrogenase interrelationships in *Rhizobia*. *Biochimie* 60: 233-236.

Dubini, A. and Sargent, F. 2003. Assembly of Tat-dependent [NiFe] hydrogenases: identification of precursor-binding accessory proteins. *FEBS Lett* 549: 141-146.

Durmowicz, M. and Maier, R. 1997. Roles of HoxX and HoxA in biosynthesis of hydrogenase in *Bradyrhizobium japonicum*. *J Bacteriol* 179: 3676-3682.

Eberz, G. and Friedrich, B. 1991. Three trans-acting regulatory functions control hydrogenase synthesis in *Alcaligenes eutrophus*. *J Bacteriol* 173: 1845-1854.

Eidness, M., Sullivan, R. and Scott, R. 1988. Electronic and molecular structure of biological nickel as studied by X-ray absorption spectroscopy. In: Lancaster, R. (Ed.). *The bioinorganic chemistry of nickel*. p 73-91. VHC Publishers, New York.

Eitingер, T. and Friedrich, B. 1991. Cloning, nucleotide sequence, and heterologous expression of a high-affinity nickel transport gene from *Alcaligenes eutrophus*. *J Bacteriol* 266: 3222-3227.

Elsen, S., Colbeau, A., Chabert, J. and Vignais, P. 1996. The *hupTUV* operon is involved in negative control of hydrogenase synthesis in *Rhodobacter capsulatus*. *J Bacteriol* 178: 5174-5181.

Elsen, S., Duche, O. and Colbeau, A. 2003. Interaction between the H₂ sensor HupUV and the histidine kinase HupT controls HupSL hydrogenase synthesis in *Rhodobacter capsulatus*. *J Bacteriol* 185: 7111-7119.

Elsen, S., Richaud, P., Colbeau, A. and Vignais, P. 1993. Sequence analysis and interposon mutagenesis of the *hupT* gene, which encodes a sensor protein involved in repression of hydrogenase synthesis in *Rhodobacter capsulatus*. *J Bacteriol* 175: 7404-7412.

Evans, H., Harker, A., Papen, H., Russel, S., Hanus, F. and Zuber, M. 1987. Physiology, biochemistry, and genetics of the uptake hydrogenase in *Rhizobia*. *Annu Rev Microbiol* 41: 335-361.

Fischer, J., Quentmeier, A., Kostka, S., Kraft, R. and Friedrich, C. 1996. Purification and characterization of the hydrogenase from *Thiobacillus ferrooxidans*. *Arch Microbiol* 165: 289-296.

- Foerster, S., van Gastel, M., Brecht, M. and Lubitz, W.** 2005. An orientation-selected ENDOR and HYSCORE study of the Ni-C active state of *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F hydrogenase. *J Biol Inorg Chem* 10: 51-62.
- Fontecilla-Camps, J., Frey, M., Garcin, E., Hatchikian, C., Montet, Y., Piras, C., Vernede, X. and Volbeda, A.** 1997. Hydrogenase: a hydrogen-metabolizing enzyme. What do the crystal structures tell us about its mode of action? *Biochimie* 79: 661-666.
- Fontecilla-Camps, J., Frey, M., Garcin, E., Higuchi, Y., Montet, Y., Nicolet, Y. and Volbeda, A.** 2001. Molecular architectures. In: Cammack, R., Frey, M. and Robson, R. (Ed.). *Hydrogen as a fuel: Learning from nature*. p 93-109. Taylor & Francis, London.
- Forzi, L., Hellwig, P., Thauer, R. and Sawers, R.** 2007. The CO and CN⁻ ligands to the active site Fe in [NiFe]-hydrogenase of *Escherichia coli* have different metabolic origins. *FEBS Lett* 581: 3317-3321.
- Fox, J., Kerby, R., Roberts, G. and Ludden, P.** 1996. Characterization of the CO-induced, CO-tolerant hydrogenase from *Rhodospirillum rubrum* and the gene encoding the large subunit of the enzyme. *J Bacteriol* 178: 1515-1524.
- Frey, M.** 1998. Nickel-iron hydrogenases: structural and functional properties. *Struct Bonding* 90: 98-124.
- Friedrich, B. and Schwartz, E.** 1993. Molecular biology of hydrogen utilization in aerobic chemolithotrophs. *Annu Rev Microbiol* 47: 351-383.
- Friedrich, B., Bernhard, M., Dornedde, J., Eitinger, T., Lenz, O., Massanz, C. and Schwartz, E.** 1996. Hydrogen oxidation by *Alcaligenes*. In: Tabita, M. and Lindstrom, F. (Ed.). *Microbial growth on C1 compounds*. p 110-117. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Friedrich, B., Heine, E., Finck, A. and Friedrich, C.** 1981. Nickel requirement for active hydrogenase formation in *Alcaligenes eutrophus*. *J Bacteriol* 145: 1144-1149.
- Friedrich, C.** 1982. Derepression of hydrogenase during limitation of electron donors and derepression of ribulosebisphosphate carboxylase during carbon limitation of *Alcaligenes eutrophus*. *J Bacteriol* 149: 203-210.
- Friedrich, C., Schneider, K. and Friedrich, B.** 1982. Nickel in the catalytically active hydrogenase of *Alcaligenes eutrophus*. *J Bacteriol* 152: 42-48.
- Fritsche, E., Paschos, A., Beisel, H. and Böck, A.** 1999. Crystall structure of the hydrogenase maturing endopeptidase HybD from *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 288: 989-998.
- Fu, C., Olson, J. and Mayer, R.** 1995. HypB protein of *Bradyrhizobium japonicum* is a metal-binding GTPase capable of binding 18 divalent nickel ions per dimer. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 2333-2337.

- Garcin, E., Vernede, X., Hatchikian, E., Volbeda, A., Frey, M. and Fontecilla-Camps, J.** 1999. The crystal structure of a reduced [NiFeSe] hydrogenase provides an image of the activated catalytic center. *Structure* 7: 557-566.
- Gilles-Gonzalez, M., Ditta, G. and Helinski, D.** 1991. A haemeprotein with kinase activity encoded by the oxygen sensor of *Rhizobium meliloti*. *Nature* 350: 170-172.
- Gogotov, I.** 1986. Hydrogenases of phototrophic microorganisms. *Biochimie* 68: 181-187.
- Green, J., Sharrocks, A., Green, B., Geisow, M. and Guest, J.** 1993. Properties of FNR proteins substituted at each of the five cysteine residues. *Mol Microbiol* 8: 61-68.
- Gu, Z., Dong, J., Allan, C., Choudhury, S., Franco, R., Moura, J., Le Gall, J., Przybyla, A., Roseboom, W., Albracht, S., Axley, M., Scott, R. and Maroney, M.** 1996. Structure of the Ni sites in hydrogenases by X-ray absorption spectroscopy. Species variation and the effects of redox poise. *J Am Chem Soc* 118: 11155-11165.
- Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166: 557-580.
- Happe, R., Roseboom, W., Egert, G., Friedrich, C., Massanz, C., Friedrich, B. and Albracht, S.** 2000. Unusual FTIR and EPR properties of the H₂-activating site of the cytoplasmic NAD-reducing hydrogenase from *Ralstonia eutropha*. *FEBS Lett* 466: 259-263.
- Happe, R., Roseboom, W., Pierik, A., Albracht, S. and Bagley, K.** 1997. Biological activation of hydrogen. *Nature* 385: 126.
- Hartmann, G., Santamaria, E., Fernandez, V. and Thauer, R.** 1996. Studies on the catalytic mechanism of H₂-forming methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase: *para-ortho* H₂ conversion rates in H₂O and D₂O. *J Biol Inorg Chem* 1: 446-450.
- Hatchikian, E., Bruschi, M. and Le Gall, J.** 1978. Characterization of the periplasmatic hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 82: 451-461.
- Haumann, M., Porthun, A., Buhrke, T., Liebisch, P., Meyer-Klaucke, W., Friedrich, B. and Dau, H.** 2003. Hydrogen-induced structural changes at the nickel site of the regulatory [NiFe] hydrogenase from *Ralstonia eutropha* detected by X-ray absorption spectroscopy. *Biochemistry* 42: 11004-11015.
- Higuchi, Y., Ogata, H., Miki, K., Yasuoka, N. and Yagi, T.** 1999. Removal of the bridging ligand atom at the Ni-Fe active site of [NiFe] hydrogenase upon reduction with H₂ as revealed by X-ray structure analysis at 1.4 Å resolution. *Structure Fold Des* 7: 549-556.

- Higuchi, Y., Yagi, T. and Yasuoka, N.** 1997. Unusual ligand structure in Ni-Fe active center and an additional Mg site in hydrogenase revealed by high resolution X-ray structure analysis. *Structure* 5: 1671-1680.
- Hoch, J. and Silhavy, T.** 1995. Two-component signal transduction. American Society for Microbiology, Washington DC.
- Holmes, D. and Quigley, M.** 1981. Rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem* 114: 193-197.
- Hube, M., Blokesch, M. and Böck, A.** 2002. Network of hydrogenase maturation in *Escherichia coli*: Role of accessory proteins HypA and HybF. *J Bacteriol* 184: 3879-3885.
- Jack, R., Buchanan, G., Dubini, A., Hatzixanthis, K., Palmer, T. and Sargent, F.** 2004. Coordinating assembly and export of complex bacterial proteins. *EMBO J* 23: 3962-3972.
- Jack, R., Dubini, A., Palmer, T. and Sargent, F.** 2005. Common principles in the biosynthesis of diverse enzymes. *Biochem Soc Trans* 33: 105-107.
- Jacobi, A., Rossmann, R. and Böck, A.** 1992. The *hyp* operon gene products are required for the maturation of catalytically active hydrogenase isoenzymes in *Escherichia coli*. *Arch Microbiol* 158: 444-451.
- Jakubke, H. and Jeschkeit, H. 1987. Chemie ABC. VEB F. A. Brockhaus Leipzig.
- Jones, A., Lenz, O., Strack, A., Buhrke, T. and Friedrich, B.** 2004. NiFe hydrogenase active site biosynthesis: identification of Hyp protein complexes in *Ralstonia eutropha*. *Biochemistry* 43: 13467-13477.
- Jouanneau, Y., Kelley, B., Berlier, Y., Lespinat, P. and Vignais, P.** 1980. Continuous monitoring, by mass spectroscopy, of H₂ production and recycling in *Rhodospseudomonas capsulata*. *J Bacteriol* 143: 628-636.
- Joyner, A., Winter, W. and Godbout, D.** 1977. Studies on some characteristics of hydrogen production by cell-free extracts of rumen anaerobic bacteria. *Can J Microbiol* 23: 346-353.
- Kessler, E.** 1973. Effect of anaerobiosis on photosynthetic reactions and nitrogen metabolism of algae with and without hydrogenase. *Arch Mikrobiol* 93: 91-100.
- Khoroshilova, N., Popescu, C., Munck, E., Beinert, H. and Kiley, P.** 1997. Iron-sulfur cluster disassembly in the FNR protein of *Escherichia coli* by O₂: [4Fe-4S] to [2Fe-2S] conversion with loss of biological activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 6087-6092.
- Kleihues, L., Lenz, O., Bernhard, M., Buhrke, T. and Friedrich, B.** 2000. The H₂ sensor of *Ralstonia eutropha* is a member of the subclass of regulatory [NiFe] hydrogenases. *J Bacteriol* 182: 2716-2724.

- Korbas, M., Vogt, S., Meyer-Klaucke, W., Bill, E., Lyon, E., Thauer, R. and Shima, S.** 2006. The iron-sulfur cluster-free hydrogenase (Hmd) is a metalloenzyme with a novel iron binding motif. *J Biol Chem* 281: 30804-30813.
- Kortlüke, C., Horstmann, K., Schwartz, E., Rohde, M., Binsack, R. and Friedrich, B.** 1992. A gene complex coding for the membrane-bound hydrogenase of *Alcaligenes eutrophus* H16. *J Bacteriol* 174: 6277-6289.
- Kovács, K. and Rákhely, G.** 2007. *Thiocapsa roseopersicina* hydrogenases: Why there are so many and what do they do? In: M. Y. Darensbourg and M. Ghirardi (Ed.). *Lecture Abstracts of the 8th International Hydrogenase Conference: Hydrogenase and Hydrogen Production*. Breckenridge, CO. p 13.
- Krasna, A.** 1979. Hydrogenase: Properties and applications. *Enzyme Microb Technol* 1: 165-172.
- Krzycki, J. and Zeikus, J.** 1984. Characterization and purification of carbon monoxide dehydrogenase from *Methanosarcina barkeri*. *J Bacteriol* 158: 231-237.
- Künkkel, A., Vorholt, J., Thauer, R. and Hedderich, R.** 1998. An *Escherichia coli* hydrogenase-3-type hydrogenase in methanogenic archaea. *Eur J Biochem* 252: 467-476.
- Kusian, B. and Bowien, B.** 1997. Organization and regulation of cbb CO₂ assimilation genes in autotrophic bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 21: 135-155.
- Laemmli, U.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Leach, M., Sandal, S., Sun, H. and Zamble, D.** 2005. Metal binding activity of the *Escherichia coli* hydrogenase maturation factor HypB. *Biochemistry* 44: 12229-12238.
- Leach, M., Zhang, J. and Zamble, D.** 2007. The role of complex formation between the *Escherichia coli* hydrogenase accessory factors HypB and SlyD. *J Biol Chem* 282: 16177-16186.
- Leclerc, M., Bernalier, A., Donadille, G. and Lelait, M.** 1997. H₂/CO₂ metabolism in acetogenic bacteria isolated from the human colon. *Anaerobe* 3: 307-315.
- Lenz, O.** 1998. Eine Wasserstoff-abhängige Signaltransduktionskette kontrolliert die Transkription eines bakteriellen Hydrogenase-Regulons. Dissertation. Humboldt-Universität zu Berlin.
- Lenz, O. and Friedrich, B.** 1998. A novel multicomponent regulatory system mediates H₂ sensing in *Alcaligenes eutrophus*. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 12474-12479.
- Lenz, O., Bernhard, M., Buhrke, T., Schwartz, E. and Friedrich, B.** 2002. The hydrogen-sensing apparatus in *Ralstonia eutropha*. *J Mol Microbiol Biotechnol* 4: 255-262.

- Lenz, O., Schwartz, E., Darnedde, J., Eitinger, M. and Friedrich, B.** 1994. The *Alcaligenes eutrophus* H16 *hoxX* gene participates in hydrogenase regulation. J Bacteriol 176: 4385-4393.
- Lenz, O., Strack, A., Tran-Betcke, A. and Friedrich, B.** 1997. A hydrogen-sensing system in transcriptional regulation of hydrogenase gene expression in *Alcaligenes* species. J Bacteriol 179: 1655-1663.
- Lenz, O., Zebger, I., Hamann, J., Hildebrandt, P. and Friedrich, B.** 2007. Carbamoylphosphate serves as the source of CN⁻, but not of the intrinsic CO in the active site of the regulatory [NiFe]-hydrogenase from *Ralstonia eutropha*. FEBS Lett 581: 3322-3326.
- Löscher, S., Zebger, I., Andersen, L., Hildebrandt, P., Meyer-Klaucke, W. and Haumann, M.** 2005. The structure of the Ni-Fe site in the isolated HoxC subunit of the hydrogen-sensing hydrogenase from *Ralstonia eutropha*. FEBS Lett 579: 4287-4291.
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. and Randall, R.** 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 193: 265-275.
- Lyon, E., Shima, S., Buurmann, G., Chowdhuri, S., Batschauer, A., Steinbach, K. and Thauer, R.** 2004. UV-A/blue-light inactivation of the 'metal-free' hydrogenase (Hmd) from methanogenic archaea. The enzyme contains functional iron after all. Eur J Biochem 271: 195-204.
- Ma, K., Hao, Z. and Adams, M.** 1994. Hydrogen production from pyruvate by enzymes purified from the hyperthermophilic archaeon, *Pyrococcus furiosus*: A key role for NADPH. FEMS Microbiol Lett 122: 245-250.
- Maier, T. and Böck, A.** 1996a. Generation of active [NiFe] hydrogenase in vitro from a nickel-free precursor form. Biochemistry 35: 10089-10093.
- Maier, T. and Böck, A.** 1996b. Nickel incorporation into hydrogenases. In: Hausinger, R., Eichhorn, G. and Marilli, L. (Ed.). Mechanism of metallocenter assembly. p 173-192. VHC Publishers, New York.
- Maroney, M. and Bryngelson, P.** 2001. Spectroscopic and model studies of the Ni-Fe hydrogenase reaction mechanism. J Biol Inorg Chem 6: 453-459.
- Maroney, M., Colpas, G., Bagyinka, C., Baidya, N. and Mascharak, P.** 1991. EXAFS investigations of the nickel site in *Thiocapsa roseopersicina* hydrogenase: evidence for a novel nickel-iron-sulfur cluster. J Am Chem Soc 113: 3962-3972.
- Maroti, G., Fodor, B., Rakhely, G., Kovacs, A., Arvani, S. and Kovacs, K.** 2003. Accessory proteins functioning selectively and pleiotropically in the biosynthesis of [NiFe] hydrogenases in *Thiocapsa roseopersicina*. Eur J Biochem 270: 2218-2227.
- Massanz, C., Fernandez, V. and Friedrich, B.** 1997. C-terminal extension of the H₂-activating subunit, HoxH, directs maturation of the NAD-reducing hydrogenase in *Alcaligenes eutrophus*. Eur J Biochem 245: 441-448.

- Matias, P., Soares, C., Saraiva, L., Coelho, R., Morais, J., Le Gall, J. and Carrondo, M.** 2001. [NiFe] hydrogenase from *Desulfovibrio desulfuricans* ATCC 27774: gene sequencing, three-dimensional structure determination and refinement at 1.8 Å and modelling studies of its interaction with the tetrahaem cytochrome c3. *J Biol Inorg Chem* 6: 63-81.
- McTavish, H., Sayavedra-Soto, L. and Arp, D.** 1996. Comparision of isotope exchange, H₂ evolution, and H₂ oxidation activities of *Azotobacter vinelandii* hydrogenase. *Biochim et Biophys Acta* 1294: 183-190.
- Medina, M., Hatchikian, E. and Cammack, R.** 1996. Studies of light-induced nickel EPR signals in hydrogenase: comparison of enzymes with and without selenium. *Biochim et Biophys Acta* 1275: 227-236.
- Meek, L. and Arp, D.** 2000. The hydrogenase cytochrome *b* heme ligands of *Azotobacter vinelandii* are required for full H₂ oxidation capability. *J Bacteriol* 182: 3429-3436.
- Menon, N., Robbins, J., Der Vartanian, M., Patil, D., Peck, H., Menon, A., Robson, R. and Przybyla, A.** 1993. Carboxy-terminal processing of the large subunit of [NiFe] hydrogenases. *FEBS Lett* 331: 91-95.
- Miller, J.** 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Monson, E., Weinstein, M., Ditta, G. and Helinski, D.** 1992. The FixL protein of *Rhizobium meliloti* can be separated into a heme-binding oxygen-sensing domain and a functional C-terminal kinase domain. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 4280-4284.
- Montet, Y., Amara, P., Volbeda, A., Vernede, X., Hatchikian, E., Field, M., Frey, M. and Fontecilla-Camps, J.** 1997. Gas access to the active site of Ni-Fe hydrogenases probed by X-ray crystallography and molecular dynamics. *Nat Struct Biol* 4: 523-526.
- Morelli, X., Czjzek, M., Hatchikian, E., Bornet, O., Fontecilla-Camps, J., Palma, N., Moura, J. and Guerlesquin, F.** 2000. Structural model of the Fe-hydrogenase/cytochrome *c553* complex combining transverse relaxation-optimized spectroscopy experiments and soft docking calculations. *J Biol Chem* 275: 23204-23210.
- Mortenson, L.** 1978. The role of dihydrogen and hydrogenase in nitrogen fixation. *Biochimie* 60: 219-223.
- Muccitelli, J. and Wen, W.** 1978. Solubilities of hydrogen and deuterium gases in water and their isotope fractionation factor. *J Solut Chem* 7: 257-267.
- Musgrave, K., Laplaza, C., Holm, R., Hedman, B. and Hodgson, K.** 2002. Structural characterization of metallopeptides designed as scaffolds for the stabilization of nickel(II)-Fe₄S₄ bridged assemblies by X-ray absorption spectroscopy. *J Am Chem Soc* 124: 3083-3092.

- Nicolet, Y., de Lacey, A., Vernède, X., Fernandez, V., Hatchikian, E. and Fontecilla-Camps, J.** 2001. Crystallographic and FTIR spectroscopic evidence of changes in Fe coordination upon reduction of the active site of the Fe-only hydrogenase from *Desulfovibrio desulfuricans*. *J Am Chem Soc* 123: 1596-1601.
- Nicolet, Y., Piras, C., Legrand, P., Hatchikian, C. and Fontecilla-Camps, J.** 1999. *Desulfovibrio desulfuricans* iron hydrogenase: the structure shows unusual coordination to an active site Fe binuclear center. *Structure Fold Des* 7: 13-23.
- Ogata, H., Hirota, S., Nakahara, A., Komori, H., Shibata, N., Kato, T., Kano, K. and Higuchi, Y.** 2005. Activation process of [NiFe] hydrogenase elucidated by high-resolution X-Ray analyses: conversion of the ready to the unready state. *Structure* 13: 1635-1642.
- Olson, J. and Maier, R.** 2000. Dual roles of *Bradyrhizobium japonicum* nickel protein in nickel storage and GTP-dependent Ni mobilization. *J Bacteriol* 182: 1702-1705.
- Olson, J., Metha, N. and Mayer, R.** 2001. Requirement of nickel metabolism proteins HypA and HypB for fully activity of both hydrogenase and urease in *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* 39: 176-182.
- Paschos, A., Bauer, A., Zimmermann, A., Zehelein, E. and Böck, A.** 2002. HypF, a carbamoyl phosphate-converting enzyme involved in [NiFe] hydrogenase maturation. *J Biol Chem* 277: 49945-49951.
- Paschos, A., Glass, R. and Böck, A.** 2001. Carbamoylphosphate requirement for synthesis of the active center of [NiFe]-hydrogenases. *FEBS Lett* 488: 9-12.
- Pavlov, M., Blomberg, M. and Siegbahn, P.** 1999. New aspects of H₂ activation by nickel-iron hydrogenase. *Intern J Quant Chem* 73: 197-207.
- Pavlov, M., Siegbahn, P., Blomberg, M. and Crabtree, R.** 1998. Mechanism of H-H activation by nickel-iron hydrogenase. *J Am Chem Soc* 120: 548-555.
- Peters, J., Lanzilotta, W., Lemon, B. and Seefeldt, LC.** 1998. X-ray crystal structure of the Fe-only hydrogenase Cpl from *Clostridium pasteurianum* to 1.8 Å resolution. *Science* 282: 1853-1858.
- Peters, J., Szilagyi, R., Naumov, A. and Douglas, T.** 2006. A radical solution for the biosynthesis of the H-cluster of hydrogenase. *FEBS Lett* 580: 363-367.
- Pfützner, J. and Schlegel, H.** 1973. Denitrifikation bei *Hydrogenomonas eutropha* Stamm H16. *Arch Microbiol* 90: 199-211.
- Pierik, A., Hulstein, M., Hagen, W. and Albracht, S.** 1998a. A low-spin iron with CN and CO as intrinsic ligands forms the core of the active site in [Fe]-hydrogenases. *Eur J Biochem* 258: 572-578.
- Pierik, A., Roseboom, W., Happe, R., Bagley, K. and Albracht, S.** 1999. Carbon monoxide and cyanide as intrinsic ligands to iron in the active site of [NiFe]-hydrogenases. NiFe(CN)₂CO, Biology's way to activate H₂. *J Biol Chem* 274: 3331-3337.

- Pierik, A., Schmelz, M., Lenz, O., Friedrich, B. and Albracht, S.** 1998b. Characterization of the active site of a hydrogen sensor from *Alcaligenes eutrophus*. FEBS Lett 438: 231-235.
- Posewitz, M., King, P., Smolinski, S., Smith, R., Ginley, A., Ghirardi, M. and Seibert, M.** 2005. Identification of genes required for hydrogenase activity in *Chlamydomonas reinhardtii*. Biochem Soc Trans 33: 102-104.
- Posewitz, M., King, P., Smolinski, S., Zhang, L., Seibert, M. and Ghirardi, M.** 2004. Discovery of two novel radical SAM proteins required for the assembly of an active [Fe]-hydrogenase. J Biol Chem 279: 25711-25720.
- Rákhely, G., Kovács, A., Maróti, G., Fodor, B., Csanádi, G., Latinovics, D. and Kovács, K.L.** 2004. Cyanobacterial-type, heteropentameric, NAD⁺-reducing NiFe hydrogenase in the purple sulfur photosynthetic bacterium *Thiocapsa roseopersicina*. Appl Environ Microbiol 70: 722-728.
- Reissmann, S., Hochleitner, E., Wang, H., Paschos, A., Lottspeich, F., Glass, R. and Böck, A.** 2003. Taming of a poison: biosynthesis of the NiFe-hydrogenase cyanide ligands. Science 299: 1067-1070.
- Rey, L., Fernandez, D., Brito, B., Hernando, Y., Palacios, J., Imperial, J. and Ruiz-Argüeso, T.** 1996. The hydrogenase gene cluster of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* contains an additional gene (*hypX*), which encodes a protein with sequence similarity to the N10-formyltetrahydrofolate-dependent enzyme family and is required for nickel-dependent hydrogenase processing and activity. Mol Gen Genet 252: 237-248.
- Rey, L., Imperial, J., Palacios, J. and Ruiz-Argüeso, T.** 1994. Purification of *Rhizobium leguminosarum* HypB, a nickel-binding protein required for hydrogenase synthesis. J Bacteriol 176: 6066-6073.
- Rossmann, R., Sauter, M., Lottspeich, F. and Böck, A.** 1994. Maturation of the large subunit (HycE) of *Escherichia coli* hydrogenase 3 requires nickel incorporation followed by C-terminal processing at Arg537. Eur J Biochem 220: 377-384.
- Rousset, M., Montet, Y., Guigliarelli, B., Forget, N., Asso, M., Bertrand, P., Fontecilla-Camps, J. and Hatchikian, E.** 1998. [3Fe-4S] to [4Fe-4S] cluster conversion in *Desulfovibrio fructosovorans* [NiFe] hydrogenase by site-directed mutagenesis. Proc Natl Acad Sci USA 95: 11625-11630.
- Sambrook, J., Fritsch, E. and Maniatis, T.** 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Sargent, F., Berks, B. and Palmer, T.** 2006. Pathfinders and trailblazers: a prokaryotic targeting system for transport of folded proteins. FEMS Microbiol Lett 254: 198-207.
- Sauter, M., Böhm, R. and Böck, A.** 1992. Mutational analysis of the operon (*hyc*) determining hydrogenase 3 formation in *Escherichia coli*. Mol Microbiol 6: 1523-1532.

- Sawers, G.** 1994. The hydrogenases and formate dehydrogenase of *Escherichia coli*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 66: 57-88.
- Schink, B. and Schlegel, H.** 1979. The membrane-bound hydrogenase of *Alcaligenes eutrophus* I. Solubilization, purification, and biochemical properties. *Biochim et Biophys Acta* 567: 315-324.
- Schlegel, H. and Schneider, K.** 1985. Microbial metabolism of hydrogen. In: Moo-Y, M. (Ed.). *Comprehensive Biotechnology*. Pergamon Press, Oxford.
- Schmidt, T., Koepke, J. and Skerra, A.** 1996. Molecular interaction between the *Strep*-tag affinity peptide and its cognate target streptavidin. *J Mol Biol* 255: 753-766.
- Schneider, K. and Schlegel, H.** 1976. Purification and properties of soluble hydrogenase from *Alcaligenes eutrophus* H16. *Biochim et Biophys Acta* 452: 66-80.
- Schubert, T., Lenz, O., Krause, E., Volkmer, R. and Friedrich, B.** 2007. Chaperones specific for the membrane-bound [NiFe]-hydrogenase interact with the Tat signal peptide of the small subunit precursor in *Ralstonia eutropha* H16. *Mol Microbiol* 66: 453-467.
- Schulz, G.** 1992. Binding of nucleotides by protein. *Curr Opin Struct Biol* 2: 61-67.
- Schwartz, E. and Friedrich, B.** 2003. The H₂-metabolizing procaryotes. In: Dworkin, M., Schleifer, K. and Stackebrandt, E. (Ed.). *The prokaryotes: an evolving electronic resource for the microbiological community*. Springer, New York.
- Schwartz, E., Gerischer, U. and Friedrich, B.** 1998. Transcriptional regulation of *Alcaligenes eutrophus* hydrogenase genes. *J Bacteriol* 180: 3197-3204.
- Schwartz, E., Henne, A., Cramm, R., Eitingner, T., Friedrich, B. and Gottschalk, G.** 2003. Complete nucleotide sequence of pHG1: A *Ralstonia eutropha* H16 megaplasmid encoding key enzymes of H₂-based lithoautotrophy and anaerobiosis. *J Mol Biol* 332: 369-383.
- Shelver, D., Kerby, R., He, Y. and Roberts, G.** 1997. CooA, a CO-sensing transcription factor from *Rhodospirillum rubrum* is a CO-binding heme-protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 11216-11220.
- Shima, S. and Thauer, R.** 2007. A third type of hydrogenase catalyzing H₂ activation. *Chem Rec* 7: 37-46.
- Shima, S., Lyon, E., Sordel-Klippert, M., Krauss, M., Kahnt, J. and Thauer, R.** 2004. The cofactor of the iron-sulfur cluster free hydrogenase Hmd: structure of the light-inactivation product. *Angew Chem Int Ed* 43: 2547-2551.
- Shima, S., Lyon, E., Thauer, R., Mienert, B. and Bill, E.** 2005. Mössbauer studies of the iron-sulfur cluster-free hydrogenase: the electronic state of the mononuclear Fe active site. *J Am Chem Soc* 127: 10430-10435.

- Shima, S., Warkentin, E., Thauer, R. and Ermler, U.** 2002. Structure and function of enzymes involved in the methanogenic pathway utilizing carbon dioxide and molecular hydrogen. *J Biosci Bioeng* 93: 519-530.
- Siegbahn, P., Blomberg, M., Wirstam née Pavlov, M. and Crabtree, R.** 2001. The mechanism of the Ni-Fe hydrogenases: a quantum chemical perspective. *J Biol Inorg Chem* 6: 460-466.
- Simon, R., Priefer, U. and Pühler, A.** 1983. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram-negative bacteria. *Bio/Technology* 1: 717-743.
- Skerra, A. and Schmidt, T.** 1999. Applications of a peptide ligand for streptavidin: the *Strep*-tag. *Biomol Engine* 16: 79-86.
- Stadler, C., de Lacey, A., Montet, Y., Volbeda, A., Fontecilla-Camps, J., Conesa, J. and Fernandez, V.** 2002. Density functional calculations for modeling the active site of nickel-iron hydrogenases. 2. Predictions for the unready and ready states and the corresponding activation processes. *Inorg Chem* 41: 4424-4434.
- Stein, M.** 2001. Insight into the mechanism of [NiFe] hydrogenase by means of magnetic resonance experiments and DFT calculations. Dissertation. Technische Universität Berlin.
- Stein, M. and Lubitz, W.** 2002. Quantum chemical calculations of [NiFe] hydrogenase. *Curr Opin Chem Biol* 6: 243-249.
- Stein, M. and Lubitz, W.** 2004. Relativistic DFT calculation of the reaction cycle intermediates of [NiFe] hydrogenase: a contribution to understanding the enzymatic mechanism. *J Inorg Biochem* 98: 862-877.
- Stein, M., van Lenthe, E., Baerends, E. and Lubitz, W.** 2001. Relativistic DFT calculations of the paramagnetic intermediates of [NiFe] hydrogenase. Implications for the enzymatic mechanism. *J Am Chem Soc* 123: 5839-5840.
- Stephenson, M. and Stickland, L.** 1931. XXVII Hydrogenase: a bacterial enzyme activating molecular hydrogen. I, the properties of the enzyme. *Biochem J* 25: 205-241.
- Strohm, T., Griffin, B., Zumft, W. and Schink, B.** 2007. Growth yields in bacterial denitrification and nitrate ammonification. *Appl Environ Microbiol* 73: 1420-1424.
- Sweet, W., Houchins, J., Rosen, P. and Arp, D.** 1980. Polarographic measurement of H₂ in aqueous solutions. *Anal Biochem* 107: 337-340.
- Tamagnini, P., Axelsson, R., Lindberg, P., Oxelfelt, F., Wunschiers, R. and Lindblad, P.** 2002. Hydrogenases and hydrogen metabolism of cyanobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 66: 1-20.
- Tersteegen, A. and Hedderich, R.** 1999. *Methanobacterium thermoautotrophicum* encodes two multisubunit membrane-bound [NiFe] hydrogenases. Transcription of

the operons and sequence analysis of the deduced proteins. Eur J Biochem 264: 930-943.

Thauer, R., Klein, A. and Hartmann, G. 1996. Reactions with molecular hydrogen in microorganisms: Evidence for a purely organic hydrogenation catalyst. Chem Rev 96: 3031-3042.

Theodoratou, E., Huber, R. and Böck, A. 2005. [NiFe]-Hydrogenase maturation endopeptidase: structure and function. Biochem Soc Trans 33: 108-111.

Thiemermann, S., DERNEDDE, J., Bernhard, M., Schroeder, W., Massanz, C. and Friedrich, B. 1996. Carboxyl-terminal processing of the cytoplasmatic NAD-reducing hydrogenase of the *Alcaligenes eutrophus* requires the *hoxW* gene product. J Bacteriol 178: 2368-2374.

Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. 1992. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. Biotechnology 24: 145-149.

Tran-Betcke, A., Warnecke, U., Böcker, C., Zaborosch, C. and Friedrich, B. 1990. Cloning and nucleotide sequences of the genes for the subunit of NAD-reducing hydrogenase of *Alcaligenes eutrophus* H16. J Bacteriol 172: 2920-2929.

Unden, G., Becker, S., Bongaerts, J., Holighaus, G., Schirawski, J. and Six, S. 1995. O₂-sensing and O₂-dependent gene regulation in facultatively anaerobic bacteria. Arch Microbiol 164: 81-90.

Van der Linden, E., Burgdorf, T., Bernhard, M., Bleijlevens, B., Friedrich, B. and Albracht, S. 2004a. The soluble [NiFe]-hydrogenase from *Ralstonia eutropha* contains four cyanides in its active site, one of which is responsible for the insensitivity towards oxygen. J Biol Inorg Chem 9: 616-626.

Van der Linden, E., Faber, B., Bleijlevens, B., Burgdorf, T., Bernhard, M., Friedrich, B. and Albracht, S. 2004b. Selective release and function of one of the two FMN groups in the cytoplasmic NAD⁺-reducing [NiFe]-hydrogenase from *Ralstonia eutropha*. Eur J Biochem 271: 801-808.

Van Soom, C., Lerouge, I., Vanderleyden, J., Ruiz-Argüeso, T. and Palacios, J. 1999. Identification and characterization of *hupT*, a gene involved in negative regulation of hydrogen oxidation in *Bradyrhizobium japonicum*. J Bacteriol 181: 5085-5089.

Vignais, P. and Colbeau, A. 2004. Molecular biology of microbial hydrogenases. Curr Issues Mol Biol 6: 159-188.

Vignais, P. and Toussaint, B. 1994. Molecular biology of membrane-bound H₂ uptake hydrogenases. Arch Microbiol 161: 1-10.

Vignais, P., Billoud, B. and Meyer, J. 2001. Classification and phylogeny of hydrogenases. FEMS Microbiol Rev 25: 455-501.

- Vignais, P., Dimon, B., Zorin, N., Tomiyama, M. and Colbeau, A.** 2000. Characterization of the hydrogen-deuterium exchange activities of the energy-transducing HupSL hydrogenase and H(2)-signaling HupUV hydrogenase in *Rhodobacter capsulatus*. J Bacteriol 182: 5997-6004.
- Volbeda, A., Charon, M., Piras, C., Hatchikian, E., Frey, M. and Fontecilla-Camps, J.** 1995. Crystal structure of the nickel-iron hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*. Nature 373: 580-587.
- Volbeda, A., Garcin, E., Piras, C., de Lacey, A., Fernandez, V., Hatchikian, E., Frey, M. and Fontecilla-Camps, J.** 1996. Structure of the [NiFe] hydrogenase active site: evidence for biologically uncommon Fe ligands. J Am Chem Soc 118: 12989-12996.
- Volbeda, A., Martin, L., Cavazza, C., Matho, M., Faber, B., Roseboom, W., Albracht, S., Garcin, E., Rousset, M. and Fontecilla-Camps, J.** 2005. Structural differences between the ready and unready oxidized state of [NiFe] hydrogenases. J Biol Inorg Chem 10: 239-249.
- Voordouw, G.** 1992. Evolution of hydrogenase genes. Adv Inorg Chem 38: 397-422.
- Voordouw, G.** 1990. Hydrogenase genes in *Desulfovibrio*. In: Belaich, J., Bruschi, M. and Garcia, J. (Ed.). Microbiology and biochemistry of strict anaerobes involved in interspecies hydrogen transfer (F.E.M.S. Symposium Series). p 37-51. Plenum Publishing Corp.
- Waugh, R. and Boxer, D.** 1986. Pleiotropic hydrogenase mutants of *Escherichia coli* K12: Growth in the presence of nickel can restore hydrogenase activity. Biochimie 68: 157-166.
- Wilde, E. and Schlegel, H.** 1982. Oxygen tolerance of strictly aerobic hydrogen-oxidizing bacteria. Antonie Van Leeuwenhoek 48: 131-143.
- Winter, G., Buhrke, T., Jones, A. and Friedrich, B.** 2004. The role of the active site-coordinating cysteine residues in the maturation of the H₂-sensing [NiFe] hydrogenase from *Ralstonia eutropha* H16. Arch Microbiol 182: 138-146.
- Winter, G., Buhrke, T., Lenz, O., Jones, A., Fogber, M. and Friedrich, B.** 2005. A model system for [NiFe] hydrogenase maturation studies: Purification of an active site-containing hydrogenase large subunit without small subunit. FEBS Lett 579: 4292-4296.
- Wolf, I., Buhrke, T., Dornedde, J., Pohlmann, A. and Friedrich, B.** 1998. Duplication of *hyp* genes involved in maturation of [NiFe] hydrogenases in *Alcaligenes eutrophus* H16. Arch Microbiol 170: 451-459.
- Wolfe, M., Heo, J., Garavelli, J. and Ludden, P.** 2002. Hydroxylamine reductase activity of the hydrid cluster protein from *Escherichia coli*. J Bacteriol 184: 5898-5902.

- Yanisch-Perron, C., Viera, J. and Messing, J.** 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33: 103-119.
- Zilberman, S., Stiefel, E., Cohen, M. and Car, R.** 2007. Theoretical studies of [FeFe]-hydrogenase: infrared fingerprints of the dithiol-bridging ligand in the active site. *Inorg Chem* 46: 1153-1161.
- Zimmer, D., Schwartz, E., Tran-Betcke, A., Gewinner, P. and Friedrich, B.** 1995. Temperature tolerance of hydrogenase expression in *Alcaligenes eutrophus* is conferred by a single amino acid exchange in the transcriptional activator HoxA. *J Bacteriol* 177: 2373-2380.
- Zorin, NA., Medina, M., Pusheva, M., Gogotov, I. and Cammack, R.** 1996. Hydrogenase from the thermophilic bacterium *Thermococcus stetteri*: Isolation and characterization of EPR-detectable redox centres. *FEMS Microbial Lett* 142: 71-76.
- Zumft, W.** 2002. Nitric oxide signaling and NO dependent transcriptional control in bacterial denitrification by members of the FNR-CRP regulator family. *J Mol Microbiol Biotechnol* 4: 277-286.

Danksagung

An erster Stelle bedanke ich mich bei Frau Prof. Dr. Bärbel Friedrich für die Überlassung des Themas, ihre zahlreichen und wertvollen Anregungen, ihre Nachsicht und Geduld.

Dr. Antonio de Lacey (Madrid) danke ich für die spektroskopische Analysen an den RH-Mutantenproteinen. Diese Messungen bilden eine wichtige Voraussetzung für die vorliegende Arbeit.

Zu Dank verpflichtet bin ich PD Dr. Michael Haumann und Dr. Simone Löscher von der Freien Universität Berlin, durch deren XAS-Analysen interessante Informationen über das aktive Zentrum der RH gewonnen werden konnten.

Für die Durchführung der Massenspektroskopie bedanke ich mich bei Dr. Eberhard Krause vom Leibniz-Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP) im Forschungsverbund Berlin e.V.

Weiterhin danke ich Dr. Simon Albracht (Amsterdam) für seine interessanten Ideen und Vorschläge bei der Suche nach einem unbekannten Kofaktor und Dr. Eddy van der Linden für FTIR-spektroskopischen Messungen an den RH_{Strep}-Proteinen.

Ein großes Dankeschön an Dr. Tanja Burgdorf, Dr. Oliver Lenz, Dr. Michael Bernhard und Dr. Thorsten Buhrke für die zahlreichen und wertvollen Anregungen, ihre Diskussions- und Hilfsbereitschaft, sowie für die nette Zusammenarbeit.

Angelika Strack sei gedankt für ihre unschätzbare Hilfe bei den zahlreichen Zellanzuchten, Zellaufschlüssen und die unglaublich vielen Lowrys, Gele und Blots.

Für die angenehme Arbeitsatmosphäre möchte ich mich auch bei Dipl. Biol. Marcus Ludwig, Dipl. Biol. Gordon Winter, Dipl. Biol. Torsten Schubert, Dr. Andrea Klink, Dr. Katja Strube, Dr. Anne Pohlmann, Dr. Rainer Cramm, Josta Hamann, Dipl. Biol. Alexander Schwarze, Janna Stöhr, Dipl. Biol. Peter Hebbeln, PD Dr. Thomas Eitingen, Dr. Edward Schwartz, Claudia Lehmann und Hannelore Schneeweiß bedanken.

Meiner Familie, meinen Eltern und Geschwistern sei an dieser Stelle für die stete Unterstützung gedankt. Die vielen Nachfragen und Sticheleien haben mich immer wieder motiviert.

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine weiteren als die angeführten Hilfsmittel verwendet habe.

Berlin, den

Antje Gebler